Epidemiologie en beheersing van Augustaziek in tulp

2002-2005

Ineke Stijger, Ineke Pennock, Toon Derks, Vincent Bijman en Miriam Lemmers

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
September 2006
PPO nr. 320657

© 2006 Wageningen, Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen of enige andere manier zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van Praktijkonderzoek Plant & Omgeving.

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V. is niet aansprakelijk voor eventuele schadelijke gevolgen die kunnen ontstaan bij gebruik van gegevens uit deze uitgave.



Projectnummer: PT 36114

Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.
Sector Bloembollen
Adres : Prof. Van Slogterenweg 2, 2161 DW Lisse
: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel. : 0252 - 462121
Fax : 0252 - 462100
E-mail : infobollen.ppo@wur.nl
Internet : www.ppo.wur.nl

Inhoudsopgave

pagina

SAMENVATTING 5

1 INLEIDING 6

2 BESTRIJDING VAN OLPIDIUM 11
2.1 Inleiding 11
2.1.1 Materialen en methoden 11
2.1.2 Resultaten 11
2.1.3 Conclusie 12
2.2 Kalkstikstof 12
2.2.1 Inleiding 12
2.2.2 Materialen en methoden 12
2.2.3 Resultaten 12
2.2.4 Conclusie 13
2.3 Pseudomonas als bestrijder van Olpidium 13
2.3.1 Inleiding 13
2.3.2 Materialen en methoden 13
2.3.3 Resultaten 14
2.3.4 Conclusie en discussie 15
2.4 Harpin 15
2.4.1 Inleiding 16
2.4.2 Materialen en methoden 16
2.4.3 Resultaten 16
2.4.4 Conclusie en discussie 17
2.5 Invloed van tussengewassen op Augusta 17
2.5.1 Inleiding 17
2.5.2 Materialen en methoden 17
2.5.3 Resultaten 18
2.5.4 Conclusies en discussie 20

3 BEHEERSING VAN AUGUSTAZIEKTE 22
3.1 Inleiding 22
3.2 Materialen en methoden 22
3.3 Resultaten 24
3.4 Conclusie en discussie 25

4 EFFECT GRONDSOORT EN/OF PELAFVAL OP SYMPTOOMEXPRESSIE BIJ ZOWEL PRIMAIR ALS SECUNDAIR AUGUSTA 26
4.1 Inleiding 26
4.2 Materiaal en methode 26
4.3 Resultaten 28
4.4 Conclusies en discussie 30

5 EFFECT VAN TEELTWIJZE OP DE UITBREIDING VAN AUGUSTAZIEKTE 31
5.1 Inleiding 31
5.2 Materialen en methoden 31
5.3 Resultaten 33
5.4 Conclusies en discussie 36

6 OLPIDIUM 36
6.1 Inleiding 36
6.2 Materiaal en methode 37

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

6.3 Resultaten en conclusies 37
7 ALGEMENE CONCLUSIES EN DISCUSSIE 38
LITERATUUR 39
LEZINGEN, ARTIKELEN EN POSTERS 39
BIJLAGE 1 EINDRAPPORTAGE LNV PROJECT 320838 42
BIJLAGE 2 ARTIKEL GEWASBESCHERMING 45

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Samenvatting

Augustaziekte in tulpen wordt veroorzaakt door tabaksnecrosevirus (TNV). De virusoverdracht vindt plaats in de grond door de zwermsporen van de bodemschimmel Olpidium brassicae. De ziekte is bovengronds zichtbaar als een ernstige necrose van de spruit kort na opkomst van het gewas (ook de bol gaat meestal verloren bij vroeg Augusta) of als necrotische vlekken op de bladeren en bloemen rond de bloeitijd (laat Augusta).
Augustaziek is in tulpen een weerkerend probleem. Er gaan jaren voorbij dat zichtbare schade beperkt is, andere jaren is er sprake van aanzienlijke schade. De schimmel kan in principe op veel grondsoorten voorkomen.

Doel van dit project was nagaan of tabaksnecrosevirus (TNV) uit een partij tulpen (grotendeels) verdwijnt bij teelt op ziektevrije zandgronden om daarmee een mogelijkheid te hebben om partijen op te knappen en verspreiding van Augusta naar gezonde gronden te voorkomen. In het onderzoek is naar verschillende aspecten gekeken die zijn ondergebracht in vier thema's te weten: bestrijding, beheersing, effect grondsoort en/of pelafval op symptoomexpressie bij zowel primair als secundair Augusta. Als laatste is het effect van teeltwijze op uitbreiding van Augusta onderzocht.

Uit dit onderzoek blijkt dat:

- Het gebruik van kalkstikstof geen remmende werking heeft op de verspreiding van Augustaziek, eerder een tegenovergesteld effect.
- Het gebruik van Pseudomonas A plus de standaard bolontsmetting minder verspreiding geeft van Augusta.
- Er geen of nauwelijks effect is waargenomen van Harpin, een bacterieel eiwit dat weerstand kan induceren in sommige gewassen.
- Toepassing van de juiste tussengewassen een goede manier kan zijn om een aantasting van Augusta in tulpen te voorkomen.
- Door het stomen van de grond Olpidium wordt gedood en wanneer grond niet wordt gestoomd nieuwe infecties (primaire besmetting) kunnen ontstaan vanuit besmette delen.
- Bij zwaar besmette partijen met vroeg Augusta deze aantasting niet terug loopt door de partijen op gestoomde grond te planten. In de praktijk het teruglopen van een aantasting vooral door selectie zal gebeuren; de aangetaste bollen hebben kleinere maten, en worden voor planten verwijderd.
- Door tulpen laat te planten de infectiedruk van Augustaziek drastisch wordt verminderd op zowel klei- als zandgrond.
- Met het toevoegen van pelafval in aanwezigheid van Augusta de infectiedruk toeneemt en dan vooral op zware gronden.
- Geen effect is vastgesteld van grondbewerking of grondstructuur op Augusta.
- Bij vroege bewerking van grasland geen Olpidium wordt gevonden. Deze methode de minste kans geeft op aantasting van tulpen door Augusta.
- In verse potgrond geen verspreiding plaats vindt maar wel vanuit oude potgrond waarin al eerder Augusta zieke bollen hebben gestaan.
- Symptoomexpressie van Augusta onvoorspelbaar blijkt te zijn.
- De waardplantenreeks van Olpidium zich niet beperkt tot cultuurgewassen maar ook in diverse onkruiden kan voorkomen.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

1 Inleiding

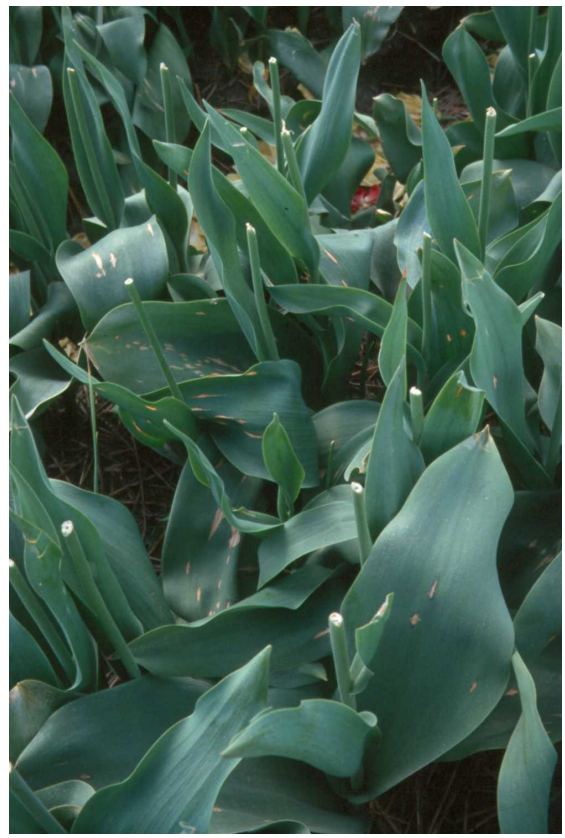
© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Augustaziekte in tulpen wordt veroorzaakt door tabaksnecrosevirus (TNV). De virusoverdracht vindt plaats in de grond door de zwermsporen van de bodemschimmel Olpidium brassicae. De ziekte is bovengronds zichtbaar als een ernstige necrose van de spruit kort na opkomst van het gewas (ook de bol gaat meestal verloren bij vroeg Augusta) of als necrotische vlekken op de bladeren en bloemen rond de bloeitijd (laat Augusta). Het virus kan ook sluimerend in het ondergrondse gewas aanwezig zijn. De schimmel kan zeer lang overleven in de grond in de vorm van rustsporen (tot 8 jaar is mogelijk) en komt voor in de wortels van meerdere onkruiden. De symptoomexpressie is jaarafhankelijk.



Figuur 1. Tulp met ziektebeeld van vroeg Augusta.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.



Figuur 2. Tulpen met symptomen (necrotische streepjes op de bladeren) van laat Augustaziek.

Augustaziek is in tulpen een weerkerend probleem. Er gaan jaren voorbij dat zichtbare schade beperkt is, andere jaren is er sprake van aanzienlijke schade. De schimmel kan in principe op veel grondsoorten voorkomen. De ziekte komt vooral tot uiting op zware gronden en kan zich daar langer handhaven in een partij dan op zandgronden. Wanneer een zieke partij van een zware grond wordt nageteeld op een zandgrond worden er minder planten zichtbaar ziek. Onduidelijk daarbij is of dit een kwestie van symptoomexpressie is of het verdwijnen van het virus uit de partij. Wanneer het virus verdwijnt uit de partij, zou tussenteelt op zandgronden gebruikt kunnen worden om partijen op te knappen en is het risico van besmetting van deze zandgronden beperkt. Daarom is onderzocht wat het effect van de grondsoort is op de epidemiologie van Augusta.
De ziekte komt veel voor in West-Friesland op zware zavelgronden na het scheuren van grasland en is ook uitgewaaierd naar andere teeltgebieden. Bovendien is het in steeds meer cultivars geconstateerd (ook in de cultivars die voorheen als redelijk resistent te boek stonden). In 2001 werden 175 partijen tulpen afgekeurd op Augustaziek, in 2002 werd dat geraamd op het dubbele.
Hoe de problematiek is in de diverse teeltgebieden en welke beheersstrategieën te ontwikkelen zijn, is in dit onderzoek opgenomen.

Tulpen worden ook geteeld voor snijbloemproductie (broeien). Bij deze teelt wordt steeds meer overgeschakeld op waterbroei i.p.v. teelt op potgrond. Door de korte trekduur (ca. 6 weken) wordt de ziekte hier niet vaak in waargenomen (geen symptoomexpressie). Echter, de afgebroeide bollen worden soms weer gebruikt als plantgoed. Uit substraatteelten met (circulerend) voedingswater is bekend dat de Olpidium-schimmel voor een flinke uitbreiding kan zorgen van diverse virussen, waaronder TNV.
De schimmel tast jonge wortels aan. Naast in tulpen, komt de schimmel voor in allerlei veel voorkomende onkruiden zoals herderstasje, vogelmuur, paardenbloem en straatgras. Binnen dit project is daarom onderzocht wat het effect is van de teeltwijze van tulp en hyacint op versrpeiding van Augusta.
Verder is aangetoond dat de ziekte via pelafval kan worden doorgegeven aan een andere partij. Het is dus denkbaar dat bij waterbroei infectie en verspreiding optreedt door slecht gepelde bollen, waar nog wat wortelrestjes aan zitten waarin de schimmel zich bevindt. Door de snelle ontwikkeling van het gewas is het mogelijk dat nieuwe infecties niet zijn waar te nemen. In de afgebroeide bollen kan dan sprake zijn van een verhoogd ziektepercentage. Met proeven in dit project komen

we tot een inschatting van een ziektepercentage in afgebroeide bollen.

Naast onderwerpen over epidemiologie die in dit project ter onderzoek liggen (bestrijdingsmogelijkheden met enkele middelen, beheersing door teeltmaatregelen, effect van grondsoort en teeltwijze op de aanwezigheid van Augusta), is gewerkt aan detectiemethoden voor TNV en een ander necrovirus dat mogelijk bij het ziekte is betrokken (in samenwerking met de Bloembollenkeuringsdienst, project 320677, PT financiering). Tijdens de duur van dit project is ook een project gestart betreffenden de detectie van de schimmel Olpidium met een PCR techniek (projectnummer 320838, LNV financiering) ter ondersteuning van dit project. Het verslag van dit LNV project is toegevoegd als Bijlage 7.
Project 320657 heeft een vervolg gekregen tot eind 2006 (projectnummer 3234016400).

In bijlage 2 is een overzichtsartikel van Augustaziek toegevoegd. Dit artikel is ook te vinden in de Gewasbescherming, jaargang 37, nummer 6 (2006)

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

2 Bestrijding van Olpidium

2.1 Inleiding

In Noord-Holland worden tulpen geteeld op zware grond. De teelt vindt veelal plaats op gescheurd huurgrasland, waarbij elk jaar op een ander perceel wordt geteeld. Dit betekent dat de infectiedruk van de bodem wat betreft Olpidium niet verlaagd kan worden door gerichte vruchtwisseling en de bestrijding tijdens de teelt zelf moet plaats vinden. Nieuwe chemische middelen zijn vooralsnog niet beschikbaar.
In dit onderzoeksdeel is daarom gezocht naar diverse mogelijkheden van bestrijding van Olpidium. In de proef is een meststof (kalkstikstof, CaCN2) getest waarvan een schimmelbestrijdende werking bekend is, twee biosurfactant producerende Pseudomonasstammen (A en C, met aangetoonde werking tegen Pythium) en een bacterieel eiwit dat mogelijk resistentie in tulp induceert (Harpin). De kalkstikstof en Harpin zijn in deze proef mede opgenomen op advies van de leverancier. Het proefveld was een deel van een voormalig graslandperceel waarop in het voorgaande seizoen zwaar door Augusta aangetaste Lucky Strike tulpen stonden.

2.1.1 Materialen en methoden

Deze proef is uitgevoerd met kalkstikstofbemesting en Pseudomonas bacteriën, om na te gaan of met deze middelen de verspreiding van tabaksnecrosevirus (TNV) door Olpidium kan worden tegengegaan, en met Harpin (om te bekijken of de resistentie van tulp kan worden verhoogd) op een proefveld in Spanbroek. In deze proef zijn de volgende behandelingen uitgevoerd:

1. Pseudomonas isolaat Ps A, gieten over bollen in de veur
2. Pseudomonas isolaat Ps C, gieten over bollen in de veur
3. Harpin 0.1% bolbehandeling
4. Harpin 0.1% bolbehandeling + 0.1% gewasbespuiting
5. CaCN2
6. Controle

In alle behandelingen is pelafval door de grond gewerkt.
Op 18 oktober 2001 is de proef geplant en per behandeling zijn 8 herhalingen uitgevoerd (cultivar Angelique).
Na oogsten zijn de bolgewichten bepaald.

2.1.2 Resultaten

Door wateroverlast op het proefveld in de Spanbroek waren de effecten van kalkstikstofbemesting, Pseudomonas bacteriën en Harpin niet statistisch betrouwbaar te bepalen. In tabel 1 staan de oogstgewichten per behandeling vermeld. Door slechte opkomst waren er extreem lage oogstgewichten in een aantal veldjes. Door zware regenval stond een groot deel van het proefveld tijdelijk onder water. Op 29 mei waren er geen gezonde planten meer. Augustaziek was niet te beoordelen door de enorme waterschade.

Tabel 1. Oogstgewichten per behandeling bij tulp (cv Angelique)

Beh nr	behandeling	Oogstgewicht (g)
1	Pseudomonas A	1134.5

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

2	Pseudomonas C	1783.4
3	Harpin 0.1% dompeling	1529.4
4	Harpin dompeling+bespuiting	1511.6
5	CaCN2	1200.6
6	controle	1887.5

2.1.3 Conclusie

Door de ongunstige omstandigheden heeft deze proef geen betrouwbare resultaten opgeleverd. In vervolgonderzoek zijn alle onderdelen in aparte proeven uitgetest.

2.2 Kalkstikstof

2.2.1 Inleiding

Doel van deze proef was, na te gaan wat het effect is van kalkstikstof op het ontstaan van Augustaziek op zware grond. Er zijn namelijk geluiden uit de praktijk dat kalkbemesting Olpidium direct kan doden, zoals de bestrijding van knolvoetschimmel (Plasmodiophora brassicae) in kool, of indirect kan bestrijden door verbetering van de bodem structuur. Ook is denkbaar dat door bekalken het microleven op de wortels zou kunnen verbeteren waardoor Olpidium sporen geen kans meer krijgen de jonge wortels binnen te dringen.
De proef is ingezet met grond afkomstig van een praktijkperceel in het gebied Spanbroek (zware grond). De toediening van de kalkstikstof was zoals die op het praktijkperceel plaatsvond.

2.2.2 Materialen en methoden

Deze proef is een zogenaamde vijvermandjesproef. Dit zijn kleinschalige proeven, uitgevoerd in plastic mandjes. Deze mandjes hebben een open structuur en een volume van 12 liter. De mandjes zijn ingegraven in de grond op het proeftuin en gevuld met besmette of niet-besmette grond en steeds beplant met 20 tulpenbollen per mandje. Deze proeven werden in het najaar ingezet en in het voorjaar beoordeeld op virussymptomen. Alle mandjesproeven in een seizoen werden op hetzelfde tijdstip ingezet.

Behandelingen in de mandjesproef:
1. Doormengen van kalkstikstof (100 g/m^2) in besmette grond
2. Kalkstikstof (100g/m^2) in bovenste 5 cm, besmette grond
3. Besmette grond
4. Doormengen van kalkstikstof (100g/m^2) + pelafval (standaard, afkomstig uit gebied Spanbroek) in besmette grond
5. Kalkstikstof (100g/m^2) in bovenste 5 cm, besmette grond + pelafval
6. Besmette grond + pelafval

Cultivar Lucky Strike.
De proef is geplant op 28 oktober 2002, en op dat tijdstip zijn ook de toevoegingen door de grond gewerkt. De proef is uitgevoerd in 8 herhalingen per behandeling.
De tulpen zijn beoordeeld op het percentage Augustaziek.

2.2.3 Resultaten

Zowel bekalken als kalkstikstofbemesting werkte niet tegen Augustaziek in tulpen. Er was zelfs een tendens naar gewasschade.
Deze proef is na overleg met de begeleidingscommissie niet herhaald.

Tabel 2. Percentage planten met Augustaziek aantasting.

	Zonder pelafval	pelafval

Kalk/gemengd	20	19
Kalk/in toplaag	9	12
controle	5	17

2.2.4 Conclusie

Toevoegen van kalkstikstof heeft geen remmende werking op de verspreiding van Augustaziek. Dit is als volgt te verklaren. Bij de omzetting van kalkstikstof, komt er cyanide vrij (H2CN2) en deze stof is een biocide, welke instabiel is en snel wordt gefixeerd in zware klei gronden. Bovendien is er bij zware gronden geen goede evenwichtige verspreiding.

2.3 Pseudomonas als bestrijder van Olpidium

2.3.1 Inleiding

Met pseudomonassoorten (o.a. Pseudomonas flurorescens) zijn goede resultaten bereikt bij de bestrijding van oomyceten, vaak door de werking van zeepachtige stoffen (biosurfactanten).
Doel van deze proeven was het bestuderen van de relatie tussen twee Pseudomonas stammen (A en C), en Olpidium zoösporen t.a.v. kolonisatie van tulpenwortels. Met Pseudomonas zijn diverse proeven gedaan en hierbij zijn de resultaten van de voorgaande proeven steeds meegenomen in de nieuwe proefopzet.
Achtereenvolgens zijn experimenten uitgevoerd met een dompeling in Pseudomonas-isolaten en de toepassing als ontsmettingsmiddel.

2.3.2 Materialen en methoden

Proef 1. Veldproef met Pseudomonas stammen in tulpen

De Pseudomonas stammen zijn in deze proef toegepast d.m.v. dompelen van de tulpenbollen in de bacterie oplossing gedurende een uur, of drenching, d.w.z. de bacterieoplossing over de tulpen aanbrengen, en dan direct de grond erover aanbrengen.
De gebruikte grondsoort in de vijvermandjes was zware klei, afkomstig van een praktijkperceel uit het gebied Spanbroek. In deze proef zijn de bollen vroeg geplant.
In deze proef is gekeken welke Pseudomonasstam en wijze van toediening het meest geschikt is en of pseudomonaden tegen zoösporen van Olpidium werken.

Tabel 3. Behandelingsschema van tulpenbollen met diverse pseudomonaden

Beh. nr	Pseudomonasstam	Behandeling
1	Ps stam A	Drench
2	Ps stam A	Dompelen
3	Ps stam C	Drench
4	Ps stam C	Dompelen
5	geen	Controle standaard beh

Cultivar: Angelique.
De proef is geplant op 15 oktober 2002 en is uitgevoerd in 8 herhalingen per behandeling.
Waarnemingen: scoren van blad en bloem symptomen en de eventuele aanwezigheid van Olpidium op de tulpenwortels waarnemen.

Proef 2A. Bol ontsmettingsproef met Pseudomonasstam A in tulpen

Doel van deze proef was om de werking van Pseudomonasstam A op Olpidium (zoösporen) te besturen. Van volgroeide cultures van Pseudomonas A op voedingsmedium is een oplossing gemaakt voor toepassing in de proef. De tulpenbollen zijn gedompeld in deze oplossing gedurende 15 minuten, of de bacterieoplossing is toegevoegd aan het bolontsmettingsbad. Ook is een behandeling met schuimen in het ontsmettingsbad opgenomen in deze proef.
De grondsoort in deze proef was zware klei, afkomstig van een praktijkperceel uit het gebied Spanbroek.

Tabel 4. Behandelingensschema van cultivar Angelique

Beh. nr	Pseudomonasstam	Bolontsmetting	Toepassing Pseudomonas
1	Ps stam A	+ zonder schuimen	Ontsmettingsbad
2	Ps stam A	+ met schuimen	Ontsmettingsbad
3	Ps stam A	--	Veur
4	Ps stam A	--	Dompelen
5	geen	+	--
6	geen	--	--

Voor deze proef is de cultivar Angelique gebruikt. De proef is geplant op 23 oktober 2003, en is uitgevoerd in 4 herhalingen per behandeling.

Proef 2B. Bol ontsmettingsproef met Pseudomonasstam A in tulpen (herhaling)
Het doel van deze proef was het bestuderen van de relatie tussen Pseudomonasstam A en Olpidium (zoösporen) als herhaling van proef 2A.
De wijze van toediening van de bacterie was door tulpenbollen te dompelen in een bacterie oplossing gedurende 15 min, of de bacterieoplossing toe te voegen aan een bolontsmettingsbad.
De grondsoort in deze proef waar de tulpen vervolgens op geteeld was zware klei, afkomstig van een praktijkperceel uit het gebied Spanbroek. De waarnemingen bestonden uit het scoren van blad-en bloemsymptomen van cultivar Angelique.

Tabel 5. Behandelingen van cultivar Angelique met Pseudomonas A

Beh. nr	Pseudomonasstam	Bolontsmetting	Toepassing Pseudomonas
1	Ps stam A	+ zonder schuimen	Ontsmettingsbad
2	Ps stam A	+ met schuimen	Ontsmettingsbad
3	Ps stam A	--	Dompelen + Sarepta mosterd
4	Ps stam A	--	Dompelen
5	geen	+ zonder schuimen	--
6	Geen	+ met schuimen	--
7	geen	--	--

Voor deze proef is de cultivar Angelique gebruikt. De proef is geplant op 7 oktober 2004 en is uitgevoerd in 4 herhalingen per behandeling.

2.3.3 Resultaten

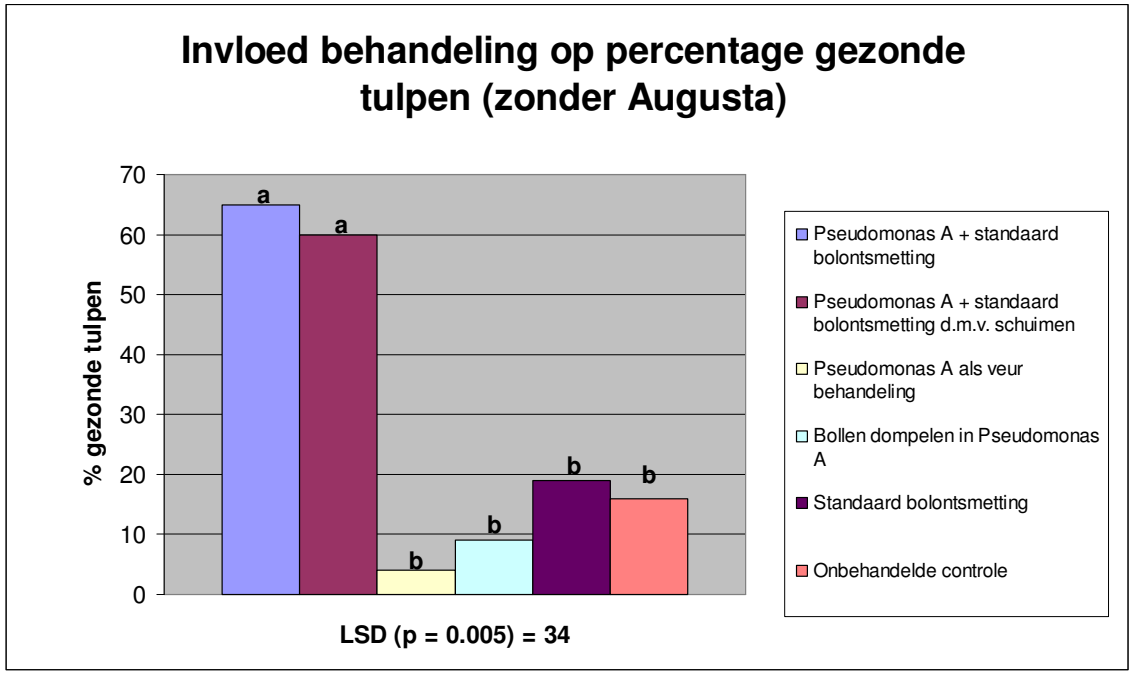
In de eerste proef blijkt een goede toepassing van Pseudomonasstam A tot 25% minder aantasting van Augustaziek in tulp te leiden, maar Pseudomonas C heeft geen effect (zie tabel 6). Omdat boldompeling betere resultaten geeft dan gieten van

de bacteriesuspensie over de bollen tijdens het planten, is dit toegepast in de vervolgproef (zie figuur 3).

Tabel 6. Percentage planten met Augustaziekaantasting in cultivar Angelique

	drench	dompelen	
Pseudomonas A	50	36	
Pseudomonas C	47	54	
controle			48

Figuur 3. Invloed van de behandeling met pseudomonaden op gezonde tulpen



Proef 2A en B

In de tweede proef (figuur 1) leidde toevoeging van Pseudomonas stam A aan het standaard ontsmettingsbad tot 65% minder aantasting door Augustaziek in tulpen. De proef is herhaald met meer aandacht voor behandeling met schuimen in het ontsmettingsbad daar dit betere resultaten gaf.

In de herhaling van deze proef (2B) werd in de vijvermandjesproeven geen infectie waargenomen. Daardoor konden van deze proeven geen resultaten beoordeeld worden. Dit komt overeen met resultaten van andere proeven en informatie uit de praktijk, waarin in dat jaar ook weinig Augusta ziek voorkwam.

2.3.4 Conclusie en discussie

Toevoegen van Pseudomonasstam A aan een standaard dompelbad geeft een goede bestrijding. Bolontsmetting met Pseudomonasstam A in het schuimbad was ook effectief. Blijkbaar kan de Pseudomonasstam A goed worden toegepast in combinatie met chemische middelen want dat zijn de bolontsmettingsmiddelen en ook bolontsmetting d.m.v. schuimen. Een veurbehandeling met alleen Pseudomonas is niet effectief.

2.4 Harpin

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

2.4.1 Inleiding

Harpin is een eiwit, dat mogelijk resistentie in tulp induceert. Dit eiwit is afkomstig van de bacterie Erwinia amylovora: een handelspreparaat is op de markt (Messinger). Harpin behoort tot een klasse eiwitten, die door bepaalde bacteriele pathogenen wordt geproduceerd in de natuur en werkt door het triggeren van een complex van natuurlijke afweermechanismen in de plant. Dit zou de plant resistent moeten maken tegen een brede groep pathogenen, waaronder schimmels. De toepassing ligt in een grote groep plantensoorten, waaronder akkerbouwgewassen gras en siergewassen. Het heeft tot zover bekend geen toxische eigenschappen voor mens en dier. Volgens de leverancier is er bij een minder gevoelige cultivar mogelijk een grotere kans dat een latente aanwezige resistentie wordt 'aangeschakeld'.
Doel van de volgende experimenten is de werking van dit preparaat te testen tegen Augusta.

2.4.2 Materialen en methoden

Proef 1. Primaire infectie (met Olpidium besmette grond met pelafval)

Het doel van deze proef was het vaststellen van het effect van Harpin op symptoomontwikkeling bij primaire infectie met een gevoelige cultivar (Angelique) en een minder gevoelige tulpencultivar (Inzell). Met primaire infectie wordt bedoeld dat gezonde bollen worden geplant in besmette grond. Dit geeft een primaire besmetting en dat wil zeggen een infectie in het lopende teeltseizoen.
De behandelingen waren:

1. Angelique, zonder Harpin
2. Inzell, zonder Harpin
3. Angelique, met Harpin bolbehandeling + gewasbespuiting, 0.1%
4. Inzell, met Harpin bolbehandeling + gewasbespuiting, 0.1 %

De proef is uitgevoerd in 5 herhalingen per behandeling. De harpin is toegediend volgens aanwijzingen van de fabrikant. Op drie tijdstippen zijn de aantallen planten met TNV symptomen geteld om eventuele effecten in de tijd te kunnen waarnemen. Als controle zijn tulpenbollen van cultivars Angelique en Inzell opgeplant (in 2 herhalingen per behandeling) ter controle of de partijen geen Augusta bevatten. Dit gebeurde in gestoomde grond om besmetting met eventueel aanwezige Olpidium te voorkomen. De uitvoering vond plaats in mandjes met elk 20 bollen.

Proef 2. Secundair Augusta in tulpen, geplant in gestoomde grond en het effect van Harpin

Het doel van dit experiment was, om vast te stellen wat het effect van Harpin in gewasbespuiting op symptoomontwikkeling bij secundair zieke bollen heeft. Secundair ziek wil zeggen bollen die al ziek zijn op het moment van planten. Het gebruik van Harpin zal daarom hooguit symptoomonderdrukkend kunnen werken. Bij het stomen van de grond wordt de eventuele aanwezige ziekteverwekker gedood.
De behandeling was een Harpin gewasbespuiting van bollen, geteeld op zware grond (cultivar Lucky Strike).
De proef is uitgevoerd in 5 herhalingen.
Beoordelingscriteria: planten zijn beoordeeld op TNV symptomen in april, mei en juni.

2.4.3 Resultaten

In de eerste proef zijn geen of nauwelijks effecten van Harpin waargenomen (tabel 7).

Tabel 7. Tulpen met TNV symptomen met en zonder Harpin in met Augustaziek-besmette grond

		Aantallen planten met TNV symptomen		
Beh nr	behandeling	18 april	7 mei	6 juni
1	Angelique - Harpin	20	20	20
2	Inzell – Harpin	20	20	20
3	Angelique + Harpin	19.6	19.6	19.6
4	Inzell + Harpin	20	20	20

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Tabel 8. Tulpen in gestoomde (gezonde) grond

		Aantallen planten met TNV symptomen		
Beh nr	behandeling	18 april	7 mei	6 juni
1A	Tulp Angelique	0	0	0
1B		0	0	0
2A	Tulp Inzell	0	0	0
2B		0	0	0

Alle partijen tulpen in de controle waren vrij van TNV aantasting (zie tabel 8). Dus infecties in proef 1 zijn ook echt nieuwe (primaire) infecties.

In tabel 9 zijn de resultaten vermeld van de met Harpin behandelde tulpen met secundair Augusta. In deze proef zijn geen zieke planten in de behandelingen waargenomen.

Tabel 9. Tulpen met TNV symptomen (cultivar Lucky Strike)

		Aantallen planten met TNV symptomen		
Beh nr	behandeling	18 april	7 mei	6 juni
1A	LS + Harpin	0	0	0
1B		0	0	0
1C		0	0	0
1D		0	0	0
1E		0	0	0

2.4.4 Conclusie en discussie

De geplante bollen van de cultivar Lucky Strike bleken niet secundair Augustaziek. Het eventuele effect van Harpin op de symptoomontwikkeling kon dientengevolge niet worden waargenomen. Echter, in de andere proeven werd geen of nauwelijks effect van Harpin waargenomen. Dit kwam overeen met door anderen uitgevoerde experimenten om dit middel te testen. De leverancier van Harpin is overigens gestopt met levering vanwege tegenvallende resultaten, ook in andere gewassen.

2.5 Invloed van tussengewassen op Augusta

2.5.1 Inleiding

Tussengewassen worden in de bollenteelt gebruikt om niet alleen als grondbedekker en organische stoftoevoer te regelen, maar ook ten nutte te zijn als stikstofvanggewasen en bestrijding van sommige aaltjessoorten. Vaak wordt bladrammenas, gele mosterd of raaigras gebruikt. Sommige tussengewassen scheiden ook stoffen uit, die bv. schimmels kunnen bestrijden. Om te bepalen of groenbemesters (tussengewassen) ingezet kunnen worden om Augustaziek te beheersen (n.a.v. goede resultaten met bestrijding van andere schimmels met groenbemesters), is een proef uitgevoerd met Sarepta mosterd als tussengewas.
Daarna is een praktijkproef bij een teler en vergelijkende proeven in Lisse uitgevoerd, om inzicht te krijgen in het effect van verschillende groenbemesters op het optreden van Augustaziek.

2.5.2 Materialen en methoden

<u>Proef 1. Sarepta mosterd als mogelijke ziektebestrijder</u>
De eerste proef is een oriënterende proef geweest naar het effect van Sarepta mosterd voor beheersing van Augustaziek.
Behandelingen:
1. Sarepta mosterd
2. Controle

De Sarepta mosterd plantjes zijn in stukjes geknipt en door de grond gemengd. Direct hierna werden de bollen geplant.

Proef 2. Toetsen effect tussengewassen op ontwikkeling van Olpidium in de teeltgrond en Augustaziek in tulpen na vroeg en laat planten

De proef is uitgevoerd op een praktijk perceel waar al eerder Augustaziek is voorgekomen (A).
Parallel is de proef uitgevoerd in vijvermandjes op de PPO proeftuin in Lisse (B).

A: praktijkproef
Deze proef is uitgevoerd op praktijkperceel A. Op stroken zijn verschillende groenbemesters geplant; er waren stroken van ongeveer ruim een meter met Bladrammenas, Gele mosterd en Sarepta.
Ongeveer 8 weken voor planten zijn de groenbemesters gezaaid. Vlak voor het planten van de bollen werden de groenbemesters geklepeld en in de grond ingewerkt met een spitfrees.
De tulpen (cultivar Angelique) zijn geplant in netten op 4 nov. 2004.

Waarnemingen: beoordeling Augustaziek d.m.v. ELISA en tellingen rustsporen Olpidium m.b.v. een biotoets met Solanum plantjes. Hierbij worden wortels van de plantjes beoordeeld op aanwezigheid van Olpidium.

B: proef op PPO tuin Lisse
De proef is uitgevoerd in vijvermandjes; op besmette grond (afkomstig van praktijkperceel B) werden de tussengewassen gezaaid. Na 8 weken werd de tussengewassen geklepeld en doorgewerkt; 2 weken later zijn tulpen, cultivar Angelique, geplant. In deze proef is ook het effect nagegaan van vroeg of laat planten.
Alle behandelingen zijn uitgevoerd in 4 herhalingen

Extra behandelingen Sarepta mosterd:
- tussengewas op PPO grond telen
- tussengewas na teelt verwijderen zonder doorwerken

Tabel 10. Toetsen effect tussengewassen op ontwikkeling van Olpidium in de teeltgrond en augustaziek in tulpen na vroeg en laat planten

Beh. nr	Tussengewas/groenbemester	Vroeg geplant (7 okt)	Laat geplant (28 okt)
1	Sarepta mosterd	+	
2	Gele mosterd	+	
3	Bladrammenas	+	
4	Sorghum	+	
5	Italiaans raaigras	+	
6	Sarepta PPO grond	+	
7	Sarepta niet doorwerken	+	
8	Controle	+	
9	Sarepta mosterd		+
10	Gele mosterd		+
11	Bladrammenas		+
12	Sorghum		+
13	Italiaans raaigras		+
14	Controle		+

Waarnemingen: aantallen rustsporen van Olpidium tellen mb.v. biotoets Solanum.

2.5.3 Resultaten

In een oriënterende proef kon een aantasting van Augustaziek deels worden voorkomen door het hakselen en onderwerken van Sarepta mosterd (proef 1, tabel 11). Dit was aanleiding om meer te doen met tussengewassen als beheersingsstrategie.

Proef 1. Sarepta mosterd als mogelijke ziektebestrijder

Tabel 11. Aantallen gezonde planten, gemiddeld per behandeling. Waarneming 29 april 2004

Behandeling	Aantal gezonde planten
Sarepta mosterd	19.75
Controle, geen Sarepta	13.67

Proef 2. Toetsen effect tussengewassen op ontwikkeling van Olpidium in de teeltgrond en augustaziek in tulpen na vroeg en laat planten

In een praktijkproef bij een teler (onderdeel A) en vergelijkende proef in Lisse (onderdeel B), om inzicht te krijgen in het effect van groenbemesters op het optreden van Augustaziek, bleek na planten van de tulpen een grote toename van rustsporen voor te komen. Vooral bij doodgespoten gras was dit effect duidelijk waar te nemen. Alleen gele mosterd gaf een duidelijke vermindering van het aantal rustsporen t.o.v. onbehandeld. Bladrammenas had geen effect, bij Sarepta was er een vermeerdering van het aantal rustsporen t.o.v. onbehandeld. Hieronder staan de resultaten van onderdelen A en B verder uitgewerkt.

A: Praktijk

Door omstandigheden is alleen laat geplant (er was een goede afspraak met de teler gemaakt maar die heeft uiteindelijk te laat geplant). In tabel 12 en 13 staan de resultaten van de ELISA toets en de aantallen Olpidium sporen in de worteltjes.

Tabel 12. Resultaten ELISA toets, op aanwezigheid TNV (QM serum)

				TNV
herkomst:		onkruiden	N planten	wortels
Perceel A	grasland	gras	7	negatief
		distel	2	negatief
Perceel C	grasberm	gras	8	negatief
		distel	2	negatief

Tabel 13. Biotoets met Solanum plantjes; toets op aanwezigheid Olpidium. Totaal aantal wortels met Olpidium per behandeling

				Olpidium in Solanum	
ingezet	perceel			N= 4 blokken, elk 5 wortels	
week 43	A	grasland	voor planten	0	
		doodgespoten gras	voor planten	0	
week43	C	grasberm	Naast bed	12	
		tulpveld	na planten	33	
				Olpidium in Solanum	
ingezet	perceel			N= 4 blokken, elk 10 wortels	
week 48	A	doodgespoten gras	3 weken na planten	>500	
		bladrammenas	3 weken na planten	59	
		sarepta	3 weken na planten	130	

		gele mosterd	3 weken na planten	9	
		onbehandeld	3 weken na planten	57	
week 48	B		uit voorraad in cel	42	2 blokken

B: PPO tuin Lisse

In tabel 14 staan de resultaten vermeld van de proef die is uitgevoerd op de tuin bij PPO Lisse. Bij een aantal tussengewassen zijn helemaal geen sporen van Olpidium meer gevonden. Dit lijkt interessant om verder uit te werken in vervolgonderzoek.

Tabel 14. Biotoets Solanum: telling Olpidium rustsporen in Solanum. Grondmonsters genomen na planten van tulpen. Gemiddelde van 4 planten

Tussengewas	Vroeg planten	Laat planten
Sarepta	6	1.25
Gele mosterd	0	0.5
Bladrammenas	5.25	1.75
Sorghum	0	0
Italiaans raai	0	0
Sarepta op PPO zand	0	
Sarepta niet doorwerken	0.75	
controle	0.5	68.75

In de controlebehandeling laat planten van de proef in Lisse kwamen veel meer rustsporen voor dan in de andere behandelingen. Alle behandelingen hebben bij laat planten een onderdrukkend effect op Olpidium. Bij vroeg planten zijn er in de controle weinig rustsporen waargenomen en daardoor is er op dat moment het onderdrukkende effect van de tussengewassen niet waar te nemen.

2.5.4 Conclusies en discussie

Toepassing van tussengewassen kan een goede manier zijn om aantasting van Augusta in tulpen te voorkomen. Dit is te zien aan het feit, dat Olpidium (althans zijn rustsporen) niet of nauwelijks meer terug te vinden zijn. Feitelijk zijn er meerdere tussengewassen (maar niet bladrammenas) die een gunstige werking vertonen. Sarepta-mosterd leek in eerste instantie een gunstig effect te hebben, maar mogelijk is gele mosterd beter omdat hierbij in de wortels minder *Olpidium* werd vastgesteld. Het economisch aspect van vroeg of laat zaaien van tussengewassen moet afgewogen worden maar is niet altijd haalbaar. In gebieden waarbij grasland wordt gehuurd voor de teelt van tulpen is het moeilijk inpasbaar. Graslanden zijn pas in september/oktober beschikbaar voor de tulpenteelt en dat is te laat om eerst een tussengewas op te zetten.
Of er een correlatie is tussen de hoeveelheid aangetroffen rustsporen en de mate van infectie door Augustaziek kon in deze proeven onvoldoende worden vastgesteld.

3 Beheersing van Augustaziekte

3.1 Inleiding

TNV behoort tot de necrovirussen, welke verspreid wordt via de schimmel Olpidium, en door mechanische oorzaken. Ook andere bolgewassen, zoals lelie en hyacint, kunnen door TNV worden aangetast. De relatie tussen ziektebeelden in hyacint en lelie met TNV is van belang in verband met vruchtwisselingsschema's. Hoe het probleem zich in hyacint voordoet, is nog onvoldoende bekend. Symptomen, veroorzaakt door TNV zijn vaak lastig te beoordelen, en onduidelijk is vaak of het wel door TNV wordt veroorzaakt.
Om te bepalen of de eerder waargenomen ziektebeelden door TNV worden veroorzaakt en om de relatie daarvan met Augustaziekte in tulp vast te stellen zijn infectieproeven ingezet met hyacint en tulp. Zo kan onderzocht worden of Olpidium ook TNV naar hyacint kan overbrengen.
In pelafval van Augustazieke partijen (grond, huid- en wortelresten) komen schimmel en virus veelvuldig voor. Als pelafval over het land wordt verspreid, raakt een nog gezond perceel ziek. Dit is ook door tulpentelers in de praktijk geconstateerd. Via infectieproeven is nagegaan wat het effect is van pelafval op symptoomontwikkeling.
Middels een praktijkproef bij drie telers, met een vergelijkende proef in Lisse, is getracht om inzicht te krijgen in de invloed van bodemstructuur op uitbreiding van Augustaziekte. In deze proef werd nagegaan, welke grondbewerking (van grasland scheuren tot aan het planten van tulpen) het meest gunstig is om Augustaziekte te beheersen.

3.2 Materialen en methoden

Proef 1A. Symptoomontwikkeling van Augustaziekte bij primaire infectie

Doel van deze proef is vaststellen hoe symptoomontwikkeling verloopt van Augustaziekte bij primaire infectie in hyacint en tulp (= besmette grond met pelafval van tulpen).

Tabel 15. Behandelingen van proef 1A; symptoomontwikkeling van Augustaziekte bij primaire infectie

Beh. Nr.	Gewas/cultivar	Vroeg planten	Laat planten
1	Hyacint White Pearl	+	
2	Hyacint Delfts Blue	+	
3	Hyacint White Pearl		+
4	Hyacint Delfts Blue		+
5	Tulp Angelique		+
6	Tulp Inzell		+

De proef is uitgevoerd in 2 herhalingen per behandeling.
Aantallen planten met TNV symptomen op 3 tijdstippen beoordeeld.

Proef 1B. gestoomde grond; controle op Augusta uit partij

Doel van deze proef: bollen opplanten ter controle of er geen Augusta voorkomt in de partijen bollen die gebruikt zijn bij proef 1A.

Behandelingen:
1. Hyacint cv. White Pearl
2. Hyacint cv. Delfts Blue
3. Tulp cv. Angelique
4. Tulp cv. Inzell

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

De proef is uitgevoerd in 2 herhalingen per behandeling.

Proef 2. Infectieproeven bij hyacint

Doel van deze proef was nagaan of hyacinten ziek worden op zandgrond met en zonder pelafval van tulpen. Het gewas is beoordeeld op symptomen, en dmv ELISA- of PCR -toetsen is op bolaantasting beoordeeld. Monsters van tulp, hyacint en lelie met symptomen van Augustaziekte zijn getest in een PCR met primers ontwikkeld voor de twee typen A en D (zie project 320677).

Behandelingen:
1. White Pearl, zandgrond + pel afval
2. White Pearl, zandgrond
3. Delfts Blue, zandgrond + pel afval
4. Delfts Blue, zandgrond

Deze proef is vroeg geplant: 8 oktober. Behandelingen 1 en 3 zijn uitgevoerd in 4 herhalingen (totaal 80 bollen), behandelingen 2 en 4 in 1 herhaling (20 bollen),

Proef 3. Invloed van grondbewerking (grasmat vertering) op Augusta ziek

Doel van deze proef is, nagaan wat de effecten zijn van grondbewerking op ontstaan van Augusta ziek. Bij omzetting van de grasmat komen er waarschijnlijk zoösporen vrij. Timing en wijze van grondbewerking zijn mogelijk sturende factoren bij dit proces.
Drie telers werkten mee aan deze praktijk proef (hierna gecodeerd als praktijkpercelen A, B en C). In een mandjesproef in Lisse is grond gebruikt afkomstig van deze drie praktijkpercelen.

Behandelingen
1. Perceel C: augustus bewerking
2. Perceel C: oktober bewerking
3. Besmette grond + pelafval, als controle
4. Perceel B zonder storende laag
5. Perceel B, gedempte sloot
6. Perceel A, normaal
7. Perceel A, koe pad (aangetrapt door koeien)

Perceel C is in augustus omgewerkt en dan licht aangedrukt. Daarna is het blijven liggen en in oktober beplant (behandeling 1). Teler C heeft het halve perceel ook volgens gangbare grondbewerking bewerkt (behandeling 2)
Perceel B: de teler heeft alleen reguliere beplanting uitgevoerd (behandeling 4). In de grond was wel een storende laag aanwezig, dus met een afwijkende, dichtere structuur. Deze is bemonsterd, om de invloed daarvan op Augustaziekte na te gaan (behandeling 5).
De teler van perceel A heeft de grond bewerkt volgens gangbare wijze (behandeling 6). Er was wel een gedeelte op het perceel, dat door koeien was aangetrapt en daardoor een afwijkende structuur had (behandeling 7).
Ervaringen van telers wijzen uit, dat er meer aantasting voorkomt op percelen waar er een verstoring van de bodemstructuur is of waar de afwatering slecht is (bijv. een gedempte sloot of koe paadje).

De proef is uitgevoerd in 4 herhalingen per behandeling, en met tulpen cultivar Angelique.
Vlak voor planten zijn de bollen ontsmet. Het aantal gezonde planten is in deze proef waargenomen.

Plant datum op de praktijkpercelen:
Perceel A: week 44/45 (2004)
Perceel B: week 43/44 (2004)
Perceel C: week 42 (2004)
De waarneming zijn uitgevoerd op 29 april 2004

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

3.3 Resultaten

In tulp bleek type D het meest voorkomend (dit werd ook bevestigd in ELISA met een antiserum gemaakt tegen dit type). In hyacint en lelie komt overwegend alleen type A voor (hiervoor is nog geen goede serologische toets beschikbaar).

In tabel 16 staan de resultaten vermeld van proef 1B. Er is vrijwel geen symptoomontwikkeling geconstateerd in beide cultivars hyacint, zowel bij vroeg als laat planten wel is een TNV aantasting waargenomen in beide cultivars tulpen, ondanks laat planten. Gemiddelde per behandeling, 2 herhalingen per behandeling, 20 bollen per mandje (= herhaling)

Tabel 16. Planten met TNV symptomen op 3 beoordelingstijdstippen

		Aantallen planten met TNV symptomen		
Beh nr	behandeling	18 april	7 mei	6 juni
1	Hyac WP vroeg	0	0	0
2	Hyac DB vroeg	0	0.5	0.5
3	Hyac WP laat	0	0	0
4	Hyac DB laat	0	0	0
5	Tulp Ang laat	1.5	1.5	2
6	Tulp Inzell laat	1	2	2.5

De resultaten van proef 1B staan vermeld in tabel 17. Alle partijen hyacinten en tulpen in deze proef waren vrij van TNV aantasting. Dus infecties in tabel 16 zijn ook echt nieuwe (primaire) infecties.

Tabel 17. Planten met TNV symptomen op 3 beoordelingstijdstippen; 20 bollen per mandje (= herhaling)

		Aantallen planten met TNV symptomen		
Beh nr	behandeling	18 april	7 mei	6 juni
1A	Hyac White Pearl	0	0	0
1B		0	0	0
2A	Hyac Delfts Blue	0	0	0
2B		0	0	0
3A	Tulp Angelique	0	0	0
3B		0	0	0
4A	Tulp Inzell	0	0	0
4B		0	0	0

In de tweede proef is geen infectie waargenomen. Dit is te verklaren doordat door de grond tulpen pelafval was gemengd. Wanneer gezonde hyacinten geplant worden op tulpengrond, worden de planten niet ziek doordat er verschillende typen van Augustaziek in beide gewassen voorkomen.

De resultaten van de derde proef staan vermeld in tabel 18. In deze proef zijn geen effecten van grondbewerking of grondstructuur op Augustaziek vastgesteld.

Tabel 18. Aantallen gezonde planten, gemiddeld per behandeling

Behandeling	Aantallen gezonde planten
1. Perceel C: augustus bewerking	20
2. Perceel C: oktober bewerking	19
3. Besmette grond + pel afval als controle	20
4. Perceel B zonder storend laag	20
5. Perceel B, gedempte sloot	19.25

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

6. Perceel A, normaal	20
7. Perceel A, koe pad	20

3.4 Conclusie en discussie

Er waren geen duidelijke aanwijzingen dat verandering van grondbewerking leidt tot minder Augustaziek. Dit geldt zowel voor de praktijkproef als de mandjesproef in Lisse.
Hyacinten zijn een geschikt gewas voor vruchtwisseling na tulpen (en mogelijk ook omgekeerd), omdat in hyacinten een ander type Augustaziek voorkomt dan in tulpen. In tulp komt TNV-A voor, en ook het nauwverwante necrovirus OMMV. Waarschijnlijk zijn de hyacinten resistent tegen TNV-A. Dit moet verder uitgezocht worden.

4 Effect grondsoort en/of pelafval op symptoomexpressie bij zowel primair als secundair Augusta

4.1 Inleiding

Van Augustaziek is bekend dat deze ziekte vooral tot uiting komt op zware gronden en ook dat ze zich daar langer kan handhaven in een partij dan op zandgronden. Wanneer een zieke partij van een zware grond wordt nageteeld op een zandgrond worden er minder planten zichtbaar ziek. Onduidelijk daarbij is of dit een kwestie van symptoomexpressie is of het verdwijnen van het virus uit de partij. Dit wordt hier nader onderzocht.
In dit onderdeel van het project zijn diverse proeven uitgevoerd om meer duidelijkheid over het effect van de grondsoort en de symptoomexpressie te krijgen. Ook is er in een proef pelafval meegenomen om na te gaan of dit een effect heeft op de symptoomexpressie in tulp.

4.2 Materiaal en methode

Proef 1. Symptoomontwikkeling van Augustaziekte op zandgrond en zware grond
In het verleden is geconstateerd dat bij nateelt van Augustazieke planten op zandgrond en in de broei een relatief gering aantal planten weer symptomen laat zien. Bij nateelt op zware zavelgronden is dit een hoog percentage. Door het ontbreken van een aantal controles ontstond het idee dat dit hoge percentage eigenlijk is opgebouwd uit een teruglopend aantal zieke planten in de nateelt net als op zandgrond, maar dat door de aanwezigheid van Olpidium in de zware zavelgrond vanuit deze zieke planten uitbreiding plaatsvindt naar omringende gezonde planten, wat resulteert in een “laat Augusta”-beeld. De eerste proef om deze zaken na te gaan is uitgevoerd in 5 herhalingen per behandeling en op 3 tijdstippen zijn de aantallen planten met TNV symptomen beoordeeld. Zie tabel 19 voor de behandelingen van proef 1.

Tabel 19. Behandelingen van proef 1; Augustaziekte-symptomen op zandgrond versus zware grond

Behandelingen	Herkomst bollen	Jaar 1 geteeld op	Jaar 2 geteeld op
1	zand (symptoomloos)	zandgrond	zandgrond
2	zand (symptoomloos)	zandgrond	zware grond
3	zand (symptoomloos)	zware grond	zandgrond
4	zand (symptoomloos)	zware grond	zware grond
5	Zware grond (+ symptomen)	zandgrond	zandgrond
6	Zware grond (+ symptomen)	zandgrond	zware grond
7	Zware grond (+ symptomen)	zware grond	zandgrond
8	Zware grond (+ symptomen)	zware grond	zware grond

Proef 2. Invloed van besmet pelafval en planttijdstip op symptoomontwikkeling
Om vast te stellen of toevoegen van pelafval aan zware (zieke) grond en aan zandgrond (gezond) meer zieke planten tot gevolg heeft, zoals al eerder in een proef is waargenomen, is onderstaande proef uitgevoerd. (zie voor behandelingen proef 2 tabel 20). Ook werd gekeken naar de invloed van planttijdstip op type symptomen. De gebruikte bolmaat in deze proef is 9/10 en de klasse: Japan (geen Augusta in partij zichtbaar geweest in 2002). Elke behandeling is uitgevoerd in 5 herhalingen, er zijn 20 bollen per mandje geplant. In deze proef zijn 2 cultivars gebruikt te weten Angelique (zeer vatbaar voor Augusta) en Inzell (minder vatbaar). De planten zijn beoordeeld op symptomen van Augustaziek.

Tabel 20. Behandelingen van proef 2: invloed van besmet pelafval en planttijdstip op symptoomontwikkeling

Behandeling	Cultivar	Vroeg planten (1-10-02)	Laat planten (11-11-02)	Grondsoort	Pelafval
1	Angelique	+		zware grond	-
2	Angelique	+		zware grond	+
3	Angelique	+		zandgrond	-
4	Angelique	+		zandgrond	+

5	Inzell	+		zware grond	-
6	Inzell	+		zware grond	+
7	Inzell	+		zandgrond	-
8	Inzell	+		zandgrond	+
9	Angelique		+	zware grond	-
10	Angelique		+	zware grond	+
11	Angelique		+	zandgrond	-
12	Angelique		+	zandgrond	+
13	Inzell		+	zware grond	-
14	Inzell		+	zware grond	+
15	Inzell		+	zandgrond	-
16	Inzell		+	zandgrond	+
17 controle	Angelique	+		zware grond gestoomd	-
18 controle	Inzell	+		zware grond gestoomd	-



Figuur 4. Mandjesproeven met op de voorgrond een zware primaire aantasting van Augustaziek in de cultivar Angelique (witroze bloemkleur)

Proef 3. Symptoomexpressie in nateelt op gestoomde grond

In de derde proef is nagegaan of symptoomexpressie (+ virusoverdracht) in de nateelt op gestoomde grond afhankelijk is van de grondsoort. Het effect van stomen is nagegaan voor zware grond: wanneer meer ziek op ongestoomde grond voorkomt dan op gestoomde grond, is er sprake van virusverspreiding (primair zieke planten) in de ongestoomde grond. Zie tabel 19 voor de behandelingen.

De proef is uitgevoerd met 2 cultivars: Angelique (eigen partij) en Lucky Strike (afkomsting van een praktijkbedrijf). De proef is 2 oktober geplant (vroeg), en is uitgevoerd in 5 herhalingen per behandeling, en er zijn 20 bollen per mandje geplant. De planten zijn beoordeeld op symptomen van Augustaziek.

Tabel 21. Behandelingen van proef 3: symptoomexpressie in de nateelt op gestoomde grond

Behandeling	Cultivar	Vroeg planten (2-10-02)	Grondsoort	Grond gestoomd
1	Angelique	+	zandgrond	+
2	Angelique	+	zware grond	+

3	Angelique	+	zware grond	-
4	Lucky Strike	+	zandgrond	+
5	Lucky Strike	+	zware grond	+
6	Lucky Strike	+	zware grond	-

Proef 4. Symptoomexpressie in de nateelt, afhankelijk van de grondsoort

Bij de laatste proef (proef 4) van dit onderdeel is nagaan of symptoomexpressie (+ virusoverdracht) in de nateelt op gestoomde grond afhankelijk is van de grondsoort. Wanneer meer ziek op ongestoomde zware grond voorkomt dan op gestoomde, dan is er sprake van virusverspreiding (primair zieke planten). In deze proef zijn vier cultivars gebruikt, namelijk Sevilla (had 2 jaar voordat deze proef werd uitgevoerd een zware Augustaziek aantasting), Synaeda Show (heeft in de vorige teelt op zand een matig zware aantasting getoond), Angelique (zeer vatbaar voor Augusta) en Inzell (minder vatbaar). Bollen van deze laatste twee cultivars waren afkomstig uit proef 2 van dit onderdeel. De proef is geplant op 9 oktober 2003 (vroeg), en elke behandeling is uitgevoerd in 4 herhalingen per behandeling.
Per behandeling is het aantal zieke planten geteld.

Tabel 22. Behandelingen proef 4: symptoomexpressie in de nateelt, afhankelijk van de grondsoort

Behandeling	Cultivar	Vroeg planten (9-10-03)	Grondsoort	Grond gestoomd
1	Angelique	+	zandgrond	+
2	Angelique	+	zware grond	+
3	Angelique	+	zware grond	-
4	Sevilla	+	zandgrond	+
5	Sevilla	+	zware grond	+
6	Sevilla	+	zware grond	-
7	Syneada Show	+	zandgrond	+
8	Syneada Show	+	zware grond	+
9	Syneada Show	+	zware grond	-
10	Syneada Show	+	zandgrond	-
11	Inzell,	+	zandgrond	+
12	Inzell,	+	zware grond	+
13	Inzell,	+	zware grond	-

4.3 Resultaten

Proef 1. Symptoomontwikkeling van Augustaziekte op zandgrond en zware grond

In de eerste proef is er weinig Augustaziek in de betreffende partij tulp geconstateerd. De grondsoort heeft in deze proef geen effect. Achteraf bleken ook de bollen afkomstig van de zware grond symptoomloos te zijn geweest.

Tabel 23. Planten met TNV symptomen op 3 beoordelingstijdstippen

Behandelingen				Aantallen planten met TNV symptomen		
Nr.	Herkomst bollen	Jaar 1 geteeld op	Jaar 2 geteeld op	18 april	7 mei	6 juni
1	zand (symptoomloos)	zandgrond	zandgrond	0.2	0.2	0.2
2	zand (symptoomloos)	zandgrond	zware grond	0.2	0.2	0.2
3	zand (symptoomloos)	zware grond	zandgrond	0	0.6	0.4
4	zand (symptoomloos)	zware grond	zware grond	0	0.4	0.2
5	Zware grond (+ symptomen)	zandgrond	zandgrond	0	0	0
6	Zware grond (+ symptomen)	zandgrond	zware grond	0	0.2	0
7	Zware grond (+ symptomen)	zware grond	zandgrond	0	0.2	0

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

8	Zware grond (+ symptomen)	zware grond	zware grond	0	0.2	0

Proef 2. Invloed van besmet pelafval en planttijdstip op symptoomontwikkeling

De resultaten van de tweede proef staan vermeld in tabel 24 en laten zien dat laat planten de infectiedruk drastisch vermindert bij beide cultivars.

Tabel 24. Percentage planten met Augustaziek aantasting; cultivar Angelique en Inzell

Behandeling	Cultivar	Vroeg planten (1-10-02)	Laat planten (11-11-02)	Grondsoort	Pelafval	Percentage zieke planten
1	Angelique	+		zware grond	-	92
2	Angelique	+		zware grond	+	95
3	Angelique	+		zandgrond	-	12
4	Angelique	+		zandgrond	+	16
5	Inzell	+		zware grond	-	88
6	Inzell	+		zware grond	+	100
7	Inzell	+		zandgrond	-	21
8	Inzell	+		zandgrond	+	15
9	Angelique		+	zware grond	-	3
10	Angelique		+	zware grond	+	5
11	Angelique		+	zandgrond	-	0
12	Angelique		+	zandgrond	+	0
13	Inzell		+	zware grond	-	2
14	Inzell		+	zware grond	+	42
15	Inzell		+	zandgrond	-	0
16	Inzell		+	zandgrond	+	5
17 controle	Angelique	+		zware grond gestoomd	-	0
18 controle	Inzell	+		zware grond gestoomd	-	11

Proef 3. Symptoomexpressie in nateelt op gestoomde grond

In de tabel 25 staan de resultaten vermeld van de derde proef. Hieruit blijkt dat in de ernstig besmette (70%) partij Angelique het Augustaziek op zowel klei als zand en wel of niet gestoomd, verder verspreid. Op ongestoomde klei werd Augustaziek ernstig verspreid in de gezonde partij Lucky Strike.

Tabel 25. Percentage planten met Augustaziek aantasting; cultivar Angelique en Inzell

Behandeling	Cultivar	Vroeg planten (2-10-02)	Grondsoort	Grond gestoomd	Percentage ziek planten
1	Angelique	+	zandgrond	+	94
2	Angelique	+	zware grond	+	81
3	Angelique	+	zware grond	-	96
4	Lucky Strike	+	zandgrond	+	0
5	Lucky Strike	+	zware grond	+	2
6	Lucky Strike	+	zware grond	-	85

Proef 4. Symptoomexpressie in de nateelt, afhankelijk van de grondsoort

De resultaten van de vierde proef staan vermeld in tabel 26. Aantal gezonde planten, gemiddeld per behandeling zijn hier weergegeven; de waarneming dateerde van 29 april 2004 (N=20). Het planten van tulpen van de cultivar Inzell op gestoomde zware zavelgrond leidde niet tot een infectie, terwijl bij de niet-gestoomde zware zavelgrond wel infectie optrad.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Nateelt van zwaar geïnfecteerde bollen op gestoomde grond leidde niet tot een verminderde infectie. Bij een zware aantasting verdwijnt het virus dus niet uit de bol. De bollen kwamen niet helemaal op of de bollen groeiden uit als zwaar geïnfecteerde planten (met een vroeg Augusta beeld). Bollen van planten met een laat Augustabeeld of een mildere infectie, zijn na de proef niet geselecteerd en nageteeld om de effecten op langere termijn te beoordelen.
De infectiegraad van de zieke partij was erg laag en leverde te weinig materiaal voor een nateelt op. Deze partij is op zand geteeld gedurende twee jaar en dan bestaat de mogelijkheid dat het infectiepercentage lager wordt.

Tabel 26. Aantallen zieke planten, gemiddeld per behandeling

Behandeling	Aantal zieke planten
1. Angelique, vroeg, zandgrond gestoomd	14.25
2. Angelique, vroeg, zware grond gestoomd	5
3. Angelique, vroeg, zware grond, niet gestoomd	6.75
4. Sevilla, vroeg, zandgrond gestoomd	5
5. Sevilla, vroeg, zware grond gestoomd	15
6. Sevilla, vroeg, zware grond, niet gestoomd	5
7. Syneada Show, vroeg, zandgrond gestoomd	0.25
8. Synaeda Show, vroeg, zware grond gestoomd	10
9. Synaeda Show, vroeg, zware grond, niet gestoomd	3.25
10. Syneada Show, vroeg, zandgrond	7.5
11. Inzell, vroeg, zandgrond gestoomd	0
12. Inzell, vroeg, zware grond gestoomd	0
13. Inzell, vroeg, zware grond, niet gestoomd	6

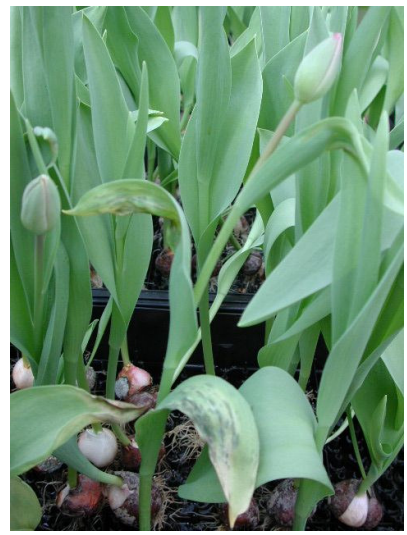
4.4 Conclusies en discussie

Door de tulpen laat te planten wordt de infectiedruk drastisch verminderd op zowel klei- als zandgrond.
Het vroeg planten op klei van een Augustaziek perceel geeft ernstiger aantasting dan planten op zandgrond. Met pelafval dat op het land wordt uitgereden neemt de infectiedruk toe en dan vooral op de zware gronden. Daarbij is er nog wel een verschil tussen een gevoelige cultivar (Angelique) en minder gevoelige cultivar (Inzell). Waarbij het pelafval een groter effect heeft bij de minder gevoelige cultivar.
Bij partijen bollen die zwaar besmet zijn met vroeg Augusta loopt de aantasting niet terug door de partijen op gestoomde grond te planten. De waarneming uit de praktijk dat wanneer een zieke partij van een zware grond wordt nageteeld op een zandgrond er minder planten zichtbaar ziek worden, lijkt vooralsnog niet bewezen. Het verzamelen van bollen met 'laat' Augustaziek in de praktijk bleek onmogelijk omdat het materiaal in netten wordt geteeld. Hierdoor kon het eventuele teruglopen van dit ziektebeeld niet worden vastgesteld.
De gebruikte cultivar Inzell in de tweede proef was waarschijnlijk niet virusvrij gezien de aantasting op gestoomde grond.
De symptoomexpressie in de nateelt was zeer wisselvallig en lijkt onafhankelijk van de grondsoort maar omdat er in deze proeven ook sprake was van 'kwade'grond zijn hier geen harde conclusies uit te trekken. Symptoomexpressie van de planten op gestoomde grond (primaire infectie) verschilde niet van secundaire (= ziek geplante bollen) infectie.

5 Effect van teeltwijze op de uitbreiding van Augustaziekte

5.1 Inleiding

Bij de teelt voor snijbloemen (broei) wordt steeds meer overgeschakeld op waterbroei i.p.v. teelt op potgrond. Door de korte trekduur (ca. 6 weken) wordt Augustaziekte hier niet vaak in waargenomen (geen symptoomexpressie). Echter de afgebroeide bollen worden vaak gebruikt als plantgoed.
Verder is aangetoond dat de ziekte via pelafval kan worden doorgegeven aan een andere partij. Het is dus denkbaar dat bij waterbroei infectie en verspreiding optreedt door slecht gepelde bollen, waar nog wat wortelrestjes aan zitten waarin de schimmel zich bevindt. Door de snelle ontwikkeling van het gewas is het mogelijk dat nieuwe infecties niet zijn waar te nemen. In de afgebroeide bollen kan dan sprake zijn van een verhoogd ziektepercentage.
De sterke verspreiding van necrovirussen (o.a. TNV) via Olpidium in watercultures bij gewassen als freesia en sla is aanleiding om te bekijken of dit bij waterbroeicultures van tulpen ook een rol speelt, en dan met name op het gebruik van de afgebroeide bollen als plantmateriaal (proef in samenwerking met BKD).
Doel van dit onderzoek is derhalve de invloed van waterbroei op de symptoomexpressie en verspreiding van Augustaziekte.



Figuur 5. Tulpen in waterbroei met secundaire infectie van Augustaziek

5.2 Materialen en methoden

<u>Proef 1. Verspreiding vanuit secundair zieke bollen</u>

In de eerste proef is nagegaan of Augusta in waterbroei verspreid kan worden vanuit secundair zieke bollen, en of het daarbij uitmaakt of er wortelresten aan de bol zitten door slecht pellen. In de wortelresten zitten mogelijk schimmelsporen die het virus over kunnen dragen op gezonde bollen.

De bollen cultivar Lucky Strike (LS) zijn het voorgaande jaar op zware grond geteeld en kunnen secundair Augusta (A) hebben. De overige bollen zijn gezond.

Behandelingen:

1. controle Angelique
2. controle Lucky Strike goed gepeld, met rijtjes Angelique ertussen geplant
3. controle Lucky Strike slecht gepeld, met rijtjes Angelique ertussen geplant
4. Angelique met pel afval eronder op broeiplaten geprikt
5. Middelste twee rijtjes Angelique met pel afval eronder op broeiplaten geprikt, overige bollen van Angelique zonder pelafval

Opmerking : Behandeling 2: 10 rijtjes LS en 4 rijtjes A
Behandeling 3: 10 rijtjes LS en 4 rijtjes A
Behandeling 5: 6 rijtjes zonder pelafval, 2 met pelafval en nog eens 6 zonder

Elk rijtje bestaat uit 10 bollen en elke behandeling is uitgevoerd in 4 herhalingen.
Waarnemingen: aantallen planten met symptomen in bloem of blad. Uitgevoerd op 10-04-2002.

Proef 2. Effect van diverse substraten op de uitbreiding van Augusta in broeitulpen (snijbloemen) en op Augusta in afgebroeide bollen (uitgangsmateriaal)

In deze proef zijn 15 cultivars (met diverse ziekte percentages: aangeleverd door BKD) en Angelique (ziek, eigen partij) en Angelique (Japan kwaliteit, als virusvrije controle) gebruikt.
Hier zijn 3 substraten vergeleken namelijk:

- watercultuur
- potgrond van een bedrijf: waar eerder tulpen op hebben gestaan
- gestoomde potgrond van PPO

Beoordelen: Augustaziek percentages in broei (jan./febr. 2003) en in nateelt van broeibollen (voorjaar 2004); nateelt op zandgrond (niet gestoomd).

Cultivarlijst

- Coquette
- Silver Dollar
- Jan Reus
- Weber Parrot
- Inzell
- Hollandia
- Friso
- Leo Visser
- Orange Monarch
- Monte Carlo
- Leen vd Mark
- Barcelona
- Carola
- Cheers
- Angelique
- True and Fair

Waarnemingen: percentage planten met Augustaziek aantasting.

Proef 3. Virusverspreiding in watercultuur

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

In de derde proef is gekeken naar de virusverspreiding in watercultuur en daarbij zijn de volgende behandelingen uitgevoerd:
1. 50 bollen Angelique (Japanklasse) + 50 Angelique (ziek uit proeven 2001/2002) per bak, 4 herhalingen
2. 100 bollen Angelique (Japan) + wortelresten (pelafval ziek), 4 herhalingen
3. 100 bollen Angelique (Japan) controle, 4 herhalingen
4 t/m 18: 50 bollen Angelique (Japan) + 50 van de cultivars 1 t/m 15 BKD (zie proef 1), 1 herhaling.

Beoordelen: Augustaziek percentages in broei (jan./febr. 2003) en in nateelt van broeibollen (voorjaar 2004) na teelt op zandgrond.
Waarnemingen: aantallen planten met symptomen/ met positieve waarden in ELISA toets. De resultaten staan per behandeling in een aparte tabel (tabellen 29 tot en met 32).

Proef 4. Nateelt van broeiproeven door het uitplanten van de bollen van het vorige teeltjaar

In de laatste proef van dit onderdeel zijn de bollen van de broeiproeven 1,2 en 3 van 2002/2003 geplant op waterculture en potgrond van verschillende herkomsten: PPO potgrond, potgrond afkomstig van een bedrijf waar eerder tulpen op hebben gestaan (besmet met Augustaziek) en gebruikte potgrond.
Waarnemingen: aantallen zieke en gezonde planten. Uitgevoerd op 29-04-2004.

5.3 Resultaten

Proef 1. Verspreiding van augustaziekte vanuit secundair zieke bollen
In de eerste proef zijn voornamelijk symptomen waargenomen in de behandeling met slecht gepelde Lucky Strike (tabel 27). Er is minder verspreiding vastgesteld bij goed gepelde bollen en geen verspreiding vanuit besmet pelafval.

Tabel 27. Aantal planten met symptomen in bloem of blad. Totaal van 4 herhaling per behandeling

		Angelique			Lucky Strike		
Beh nr	beh	N (herh)	bloem	blad	N (herh)	bloem	blad
1	Contr Ang	140	0	0			
2	LS goed gepeld	40	0	0	100	2	2
3	LS slecht gepeld	40	0	0	100	10	12
4	Ang + pelafval	140	0	0			
5	Ang + en - pelafval	140	0	0			

Proef 2. Effect van diverse substraten op de uitbreiding van Augusta in broeitulpen (snijbloemen) en op Augusta in afgebroeide bollen (uitgangsmateriaal)
Uit de resultaten van de tweede proef blijkt dat er geen uitbreiding van Augustaziek is waargenomen in de (water)broei van tulpen afkomstig van Augustazieke partijen, die door de BKD waren geselecteerd (tabel 28). Er zijn geen grote verschillen tussen broeisystemen wat betreft ontstaan van Augusta ziek in dit broeiseizoen bij nateelt van zieke partijen. Tussen cultivars/partijen bestaan wel verschillen in de mate waarin Augustaziek terugkomt bij nateelt.

Tabel 28. Percentage planten met Augustaziek aantasting

	Broeisysteem		
Cultivar	water	Potgrond PPO	Potgrond bedrijf
Coquette	17	20	21
Silver Dollar	1	2	2
Jan Reus	4	3	5
Weber Parrot	1	0	0
Inzell	2	0	0
Hollandia	0	6	3
Friso	15	21	21
Leo Visser	0	0	0

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Orange Monarch	12	16	13
Monte Carlo	0	0	0
Leen vd Mark	2	2	4
Barcelona	1	0	0
Carola	0	0	0
Cheers	1	4	5
Angelique	4	13	5
True and Fair	24	16	24

Proef 3. Virusverspreiding in watercultuur

In tabel 29 staan de resultaten van behandeling 1 van de derde proef, in tabel 30 van behandeling 2, in tabel 31 van behandeling 3 en tabel 32 van behandeling 4. In deze proef is geen verspreiding vastgesteld vanuit zieke naar gezonde bollen. Resultaten van de ELISA toets komen goed overeen met de beoordeling van de visuele symptomen.

Tabel 29. Aantallen planten met symptomen/ met positieve waarden in ELISA toets.
Behandeling 1: Angelique (Japan kwaliteit) + Angelique (ziek)

herhaling	symptomen	getoetst	ELISA positief
A	0	10	0
B	0	10	0
C	0	10	0
D	0	10	0

Tabel 30. Aantallen planten met symptomen, en met positieve waarden in ELISA toets.
Behandeling 2: Angelique (Japan kwaliteit) + pelafval (ziek). Totaal 100 bollen per herhaling (bak waterbroei), 4 herhalingen

herhaling	symptomen	getoetst	ELISA positief
A	0	30	0
B	0	30	0
C	0	30	0
D	0	30	0

Tabel 31. Aantallen planten met symptomen, en met positieve waarden in ELISA toets.
Behandeling 3: Angelique (Japan), controle. Totaal 100 bollen per herhaling (bak waterbroei), 4 herhalingen

herhaling	symptomen	getoetst	ELISA positief
A	0	10	0
B	0	10	0
C	1	10	1
D	0	10	0

Tabel 32. Aantallen planten met symptomen, en met positieve waarden in ELISA toets
Behandeling 4: Angelique (Japan) + cultivars BKD uit proef 1. Totaal 100 bollen per herhaling (bak waterbroei), 4 herhalingen

Cultivar	symptomen	getoetst	ELISA positief
Coquette	0	10	0
Silver Dollar	0	10	0
Jan Reus	0	10	0
Weber Parrot	0	10	0
Inzell	0	10	0
Hollandia	0	10	0
Friso	0	10	0
Leo Visser	0	10	0
Orange Monarch	0	10	0
Monte Carlo	0	10	0
Leen vd Mark	0	10	0

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Barcelona	1	10	1
Carola	0	10	0
Cheers	0	10	0
Angelique	0	10	0
True and Fair	0	10	0

Proef 4. Nateelt van broeiproeven door het uitplanten van de bollen van het vorige teeltjaar

In tabel 33 staan de resultaten van de vierde proef vermeld. In de nateelt (van proef 2) was er geen uitbreiding van Augustaziek waar te nemen bij tulpen afkomstig van het (water)broei van Augustazieke partijen, die door de BKD geselecteerd waren. Kunstmatig infecteren van potgrond of tulpenbroei op besmette potgrond leidde niet tot uitbreiding van Augusta. Er was geen directe uitbreiding van de ziekte tijdens de broei en ook geen toename in de nateelt. Het is mogelijk is dat de zwaar aangetaste bollen door hun kleine maat worden uitgeselecteerd en daardoor een lagere aantasting in de broei voorkomt dan onder veldomstandigheden.

Tabel 33. Aantallen zieke planten. Nateelt van proef 2

Cultivar	PPO grond nateelt van gezonde planten	PPO grond nateelt van zieke planten	Oude potgrond nateelt van gezonde planten	Oude potgrond nateelt van zieke planten	Water cultuur nateelt van gezonde planten	Water cultuur nateelt van zieke planten
Coquette	0		0		0	
Silver Dollar	0		0	5	0	
Jan Reus	0		0	4	0	4
Weber Parrot	0		1		0	1
Inzell	0		0		0	1
Hollandia	0	4	0	7	0	
Friso	0	8	2	10	0	4
Leo Visser	0		0		0	
Orange Monarch	0	3	1	3	0	3
Monte Carlo	0		0		0	8
Leen vd Mark	0	0	0	0	0	0
Barcelona	0		0		0	
Carola	0		0		0	
Cheers	0		0		0	0
Angelique	0	12	0	6	0	2
True and Fair	0	3	1		0	2
Angelique Japan	0		0		0	
Angelique ziek	13					

5.4 Conclusies en discussie

Verwacht werd, dat in waterbroei Augustaziek verspreid zou kunnen worden via slechtgepelde bollen waar ook schimmel in aanwezig is: Olpidium die dan voor infectie zou kunnen zorgen. Dit werd niet geconstateerd. Ook kunstmatig geïnfecteerde verse potgrond leverde geen verspreiding op.
Wel werd vanuit oude potgrond waarin al eerder Augusta zieke bollen hebben gestaan, Augustaziek verspreid. Ook zijn er grote verschillen in gevoeligheid van de diverse cultivars en partijen die gebruikt zijn; dit bleek in de nateelt van o.a. de cv's Coquette, Friso en Orange Monarch.

6 Olpidium

6.1 Inleiding

Het aantonen van Olpidium is van belang, daar deze als vector van necrovirussen ook in andere teelten, oa. teelten onder glas, van belang is. Een objectieve, biochemische toets om snel Olpidium in bv. Wortelresten te kunnen aantonen, is wenselijk. Dit is uitgezocht binnen een LNV-project. Water- of substraatcultures (met een circulatiesysteem) zijn een ideaal medium voor de zwermsporen van Olpidium-soorten om zich te verplaatsen. Op deze wijze is een explosieve verspreiding van diverse virussen geconstateerd in kasgewassen als komkommer, sla en fresia. Bij de (water)broei van tulpen speelt voor zover bekend alleen O. brassicae een rol in de verspreiding van TNV en/of andere necrovirussen. Meestal wordt virusverspreiding bij tulpen niet geconstateerd tijdens de waterbroei. Echter de enorme toename van Augustaziekte in tulpen in de laatste jaren doet vermoeden dat het gebruik van afgebroeide bollen als uitgangsmateriaal een belangrijke oorzaak van deze toename is; door de korte trekduur van broeitulpen kan de virusverspreiding pas zichtbaar worden bij nateelt. Om een effectieve gewasbeschermingsstrategie te ontwikkelen is er behoefte aan een toets ter detectie en identificatie om vast te stellen of, wanneer en in welke mate (virusbesmette) Olpidium voorkomt in water- en substraatcultures van tulp. Voor watercultures is hierbij een concentratiestap nodig, waarvoor gebruik gemaakt zal worden van filters. Nagegaan zal worden of deze filtertechniek in principe gebruikt kan worden om virusverspreiding via circulatiesystemen tegen te gaan. Met deze detectie- en filtermethoden wordt gericht op een beheersstrategie met zo min mogelijk chemische middelen en een hogere opbrengst bij teler/broeier.
Eerst is een detectiemethode voor Olpidium-soorten ontwikkeld op basis van PCR met algemene primers. Omdat Olpidium niet direct in water en substraatcultures kan worden aangetoond met PCR is gebruik gemaakt van een concentratiestap met een filter.
Voor het ontwikkelen van deze PCR toets op Olpidium (LNV programma 397-III, project 320838) zijn binnen dit project grondmonsters en wortels van planten verzameld. Daarnaast zijn ook de waardplanten voor TNV en Olpidium brassicae in kaart gebracht.
De door PPO in samenwerking met PRI ontwikkelde PCR-toets voor het aantonen van Olpidium is ingezet in het epidemiologisch onderzoek, vooral voor het aantonen van deze vector in wortels van planten en in grondmonsters. Deze PCR-toets is binnen het LNV-programma verder verfijnd voor de detectie van Olpidium brassicae in watercultures.

6.2 Materiaal en methode

Aantonen van Olpidium brassicae
Er zijn praktijkmonsters genomen tijdens het broeiseizoen. Wortels van gewassen zijn direct onder de microscoop beoordeeld, of er is een biotoets ingezet waarbij Solanum villosum als vangplant werd gebruikt (indirecte methode). In dat geval werden wortels van het te toetsen gewas gedroogd, verpulverd en door gestoomde grond gemengd. Daarna zijn de toetsplanten gezaaid, en zijn later de wortels daarvan beoordeeld op aanwezigheid van Olpidium rustsporen.

6.3 Resultaten en conclusies

De detectie van Olpidium in grond met PCR is mogelijk in de organische stoffractie en na centrifugeren van het in water opgenomen grondmonster. De PCR detectie werd gevalideerd door het gebruik van vangplanten die door Olpidium besmet kunnen worden. Het was mogelijk Olpidium aan te tonen, maar de procedure kan nog verfijnd worden.
Olpidiumdetectie in wortels is mogelijk met een microscoop en met PCR. In wortels van diverse onkruiden (o.a. muur, straatgras, kweek en paardebloem) van gescheurd grasland werden veel (rust)sporen van Olpidium aangetroffen (tabel 34). Deze detectiemethode kan nu gebruikt worden bij het epidemiologisch onderzoek

Tabel 34. Inventarisatie waardplanten voor TNV en Olpidium brassicae

TNV		**Olpidium brassicae**	
Gewas	Familie	Gewas	Familie
Tulp	Lelie	Tulp	Lelie
Chinese kool	Kruisbloemigen	Chinese kool	Kruisbloemigen
Gerst	Granen	Gerst	Granen
Peen	Schermbloemigen	Peen	Schermbloemigen
Mosterd	Kruisbloemigen	Mosterd	Kruisbloemigen
Muur	Anjer	Muur	Anjer
Aardappel	Nachtschade	Kamille	Samengesteldbloemigen
Luzerne	Vlinderbloemigen	Herderstasje	Kruisbloemigen
Ui	Lelie	Straatgras	Grassen
Spinazie	Ganzevoet	Kweek	Grassen
Hyacint	Lelie	Zwarte nachtschade	Nachtschade
Lelie	Lelie		

Olpidium werd vooral gevonden in de jonge wortels en in de uiteinden van de wortels. In deze wortels bleken alle stadia van de schimmel aanwezig te zijn.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

7 Algemene conclusies en discussie

Uit de vele proeven die uitgevoerd zijn binnen het project Epidemiologie en beheersing van Augustaziek in tulp kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

- Uit de veldproeven die het eerste jaar van dit project zijn uitgevoerd geen conclusies zijn te trekken door de grote waterschade die de planten hadden opgelopen.
- Het gebruik van Pseudomonasstam A in combinatie met de chemische middelen die in de standaard bolontsmetting zitten geeft minder verspreiding van Augustaziek.
- Het gebruik van kalkstikstof geen remmende werking heeft op de verspreiding van Augustaziek, eerder een tegenovergesteld effect.
- Er geen of nauwelijks effect is waargenomen van Harpin op de symptoomvorming en uitbreiding van Augustaziek.
- Het gebruik van tussengewassen leidt bij laat planten van de tulpen tot een verlaging van de Olpidium in de grond. Dit effect is niet te zien bij vroeg planten. Mogelijk hebben deze tussengewassen ook een effect op het gedeeltelijk voorkomen van Augusta. Dit is voor Sareptamosterd éénmalig gevonden. Herhaling is nodig voor een goede uitspraak.
- Dat door het stomen van de grond Olpidium wordt gedood en wanneer grond niet wordt gestoomd nieuwe infecties (primaire infectie) kunnen ontstaan vanuit ziek geplante bollen (secundaire infectie) door de in de grond aanwezige Olpidium.
- Dat bij zwaar besmette partijen met vroeg Augusta deze aantasting niet terug loopt door de partijen op gestoomde grond te planten. Dit is nog niet uitgezocht voor de nateelt van tulpen met ‘laat Augusta’. In de praktijk het teruglopen van een aantasting vooral door selectie zal gebeuren; de aangetaste bollen hebben kleinere maten, en worden voor het planten verwijderd.
- Dat door tulpen laat te planten de infectiedruk van Augustaziek drastisch wordt verminderd op zowel klei- als zandgrond.
- Dat met het toevoegen van pelafval de infectiedruk toe neemt en dan vooral op zware gronden. Het is dus voor de praktijk niet aan te raden om pelafval op het land uit te rijden of het pelafval moet eerst worden gecomposteerd.
- Dat er geen effect is vastgesteld van diverse grondbewerkingen of bepaalde structuren van de grond op Augusta.
- Dat alleen bij een vroege bewerking van grasland geen Olpidium wordt gevonden. Deze methode geeft mogelijk de minste kans geeft op aantasting van tulpen door Augusta.
- Dat symptoomexpressie van Augusta onvoorspelbaar blijkt te zijn.
- Uit de infectieproeven met hyacint blijkt dat dit gewas waarschijnlijk geen problemen geeft bij vruchtwisseling met tulp. In tulp blijkt namelijk type D van TNV het meeste voor te komen en in hyacint en lelie komt overwegend alleen type A voor. In dit onderzoek is wel de weg onderzocht van grond waar zieke tulpen op hebben gestaan en vervolgens hyacinten. De andere weg dus grond waar zieke hyacinten op hebben gestaan en vervolgens gezonde tulpen is niet onderzocht omdat dergelijke grond op dat moment niet beschikbaar was.
- Dat de grootschalige proeven in de waterbroei en in verse potgrond geen verspreiding plaatsvindt, maar wel vanuit oude potgrond waarin al eerder Augusta zieke bollen hebben gestaan. In de praktijk is incidenteel wel een verspreiding in waterbroei geconstateerd.
- Dat de waardplantenreeks van Olpidium zich niet beperkt tot cultuurgewassen; de schimmel kan ook in diverse onkruiden voorkomen, waaronder onkruiden die veelvuldig voorkomen in graslanden. Daardoor is het niet verwonderlijk dat in de teelt van tulpen op gescheurde graslanden vaak Augustasziek wordt geconstateerd.

Op basis van resultaten van de uitgevoerde proeven binnen dit project en resultaten en ervaringen uit eerder uitgevoerd onderzoek is recent een artikel geschreven en geplaatst in Gewasbescherming (Jaargang 37 nummer 6 die als bijlage is opgenomen in dit verslag).

Literatuur

Asjes, C.J., 1994. Augustaziek in tulpen. Minder kans bij teelt op zand. Bloembollencultuur 105: 40-42
Asjes, C.J. and Blom-Barnhoorn, G.J., 1996. Control of Augusta disease caused by tobacco necrosis virus in tulip affected by culture conditions and soil disinfestation. In: Proceedings 3rd symposium of International working group on plant viruses with fungal vectors. Eds.: J.I. Sherwood and C.M. Rush, Dundee, Scotland: 125-128
Cardoso, J.M.S., Félix, M.R., Oliveira, S. and Clara, M.I.E., 2005. The complete genome of a new necrovirus isolated from *Olea europaea* L. Arch. Virol. 150: 815-823
De Bruyn Ouboter, M.P. en van Slogteren, E., 1949. Het Augusta-ziek der tulpen, een virus-ziekte van het tabaks-necrosetype. Tijdschrift over plantenziekten 55: 262-267
Meulewater, F., Danthinne, X. and van Emmelo, J., 1994. Necroviruses. In: Encyclopedia of Virology, vol.2 (Eds. R.C. Wester and A. Granoff), San Diego, Academic Press
Nahata, K., Kusaba, T. and Mukobata, H., 1988. Studies on the ecology and control of tulip virus diseases. Bull. Toyama Agric.Res.Ctr., no. 2: 1-132
Van Slogteren, D.H.M. and Visscher, H.R., 1967. Transmission of a tobacco necrosis virus, causing “Augusta disease” to the roots of tulip by zoospores of the fungus *Olpidium brassicae* (Wor.) Dang. Meded. Rijksfaculteit Lanbouwwetenschappen Gent 32: 927-938

Lezingen, artikelen en posters

2002

Artikelen:
Dwarswaard, A., 2002. Augustaziekte: Cultivars in meer gebieden besmet. Bloembollencultuur 113 (12): 12-13. (interview).

Poster:
Open Dagen PPO Lisse,31-1 en 1-2-2002.
Open Dag Proeftuin Zwaagdijk 7-6-2002).
Derks, T., Bruggen, A.S. van, en Blom-Barnhoorn, G.: Kans op Augustaziek in tulp te reduceren.

Lezingen:
T. Derks: Augustaziekte in tulpen.
6-8-2002 te Bovenkarspel voor KAVB, kring West-Friesland en CNB
22-8-2002 te Creil voor NLTO, kring Flevoland en CNB
14-10-2002 te Lisse voor KAVB, kring Duin- en Bollenstreek en CNB
19-11-2002 in De Goorn, KAVB studieclub De Goorn e.o.

2003

Artikelen
1. Toon Derks, Khanh Pham, Miriam Lemmers en Gerry Blom-Barnhoorn, 2003. Augustaziek ook in hyacint en lelie. BloembollenVisie 5: 18-19
2. Toon Derks, Khanh Pham, Miriam Lemmers en Gerry Blom-Barnhoorn, 2003. Ook hyacint en lelie hebben last van Augustaziekte. Vakblad voor Bloemisterij 14: 54-55
3. Vincent Bijman, Toon Derks en Gerry Blom-Barnhoorn, 2003. Augustaziek tast tulp weer aan, Vakblad voor de Bloemisterij, 17: 56
4. Telefonisch interview voor artikel over onderzoeksresultaten op open dag PPO Lisse, Westweek, 2003, jaargang 11, 21:11
5. Vincent Bijman, Toon Derks en Gerry Blom-Barnhoorn, 2003. Bodemaspecten bij Augustaziek, BloembollenVisie 18: 22-23

Begeleidingscommissie
1. Bijeenkomst in Lisse, 1 april 2003. Nadruk op broeierij en op veldproeven op de tuin
2. Bijeenkomst in De Goorn, 20 augustus 2003, Nadruk op teelt en komende teeltseizoen (inspraak in keuze voor proeven 2004)

Posters gebruikt voor Open Dagen
1. Augustaziek in de broei, 2003
2. Augustaziek tijdens teeltseizoen, 2003

Presentaties bij Open dagen
1. PPO broeierij, Lisse: 13 en 14 februari 2003
2. Proeftuin Zwaagdijk, 19 februari 2003
3. Lentetuin, Breezand, 2 maart 2003
4. PPO De Noord, 15 mei 2003
5. PPO open teelt, Lisse 21 mei 2003

Lezingen
1. 15 januari 2003, 't Veld. Toon Derks: Augustaziek (teeltmaatregelen) en LSV (verspreiding) in tulp. Studiegroep Niedorp & Omstreken.
2. 19 februari 2003, Lauwersoog. Toon Derks: Ins en outs van Augusta in tulp. Bloembollentelers regio Noordoost

2004

Artikelen

1. Vincent Bijman, Toon Derks en Gerry Blom-Barnhoorn, 2004. Perspectieven voor bestrijding van Augustaziekte in tulpen, BloembollenVisie 43, 20-21
2. Vincent Bijman, Toon Derks en Gerry Blom-Barnhoorn, 2004. Laat kennis voorvrucht meespelen bij Augustaziek, BloembollenVisie 45: 24

Begeleidingscommissie

Bijeenkomst in Lisse, 27mei 2004. Nadruk op broeierij (nateelt van afgebroeide tulpen) en op veldproeven op de tuin. In augustus nog een informele bijeenkomst met enkele telers uit de begeleidingscommissie, over uitvoering van groenbemestingproeven op hun percelen.

Posters gebruikt voor Open Dagen

1. Augustaziek in de broei, 2003
2. Augustaziek tijdens teeltseizoen, 2003

Presentaties bij Open Dagen

- 13 en 14-2-2003, Open middagen PPO te Lisse. V. Bijman, A. Derks en G. Blom-Barnhoorn: Demonstratie van en poster over broeierij-onderzoek Augustaziekte in tulpen
- 27-5-2004, Open middag PPO te Lisse. V. Bijman, A. Derks en G. Blom-Barnhoorn: Demonstratie van nateelt van broeierij-onderzoek Augustaziekte in tulpe

Lezingen

- 16-2-2004, De Goorn. Lezing van V. Bijman over Augustaziekte in tulpen voor ca. 30 tulpentelers (KAVB-studieclub De Goorn).
- 11-3-2004, Taichung, Taiwan. Lezing V. Bijman: Recent development of Augusta disease in the Netherlands. 11th International symposium on virus diseases of ornamental plants
- 27-9-2004, Limmen. Lezing van V. Bijman over Augustaziekte in tulpen voor ca. 20 tulpentelers (KAVB-kring Kennemerland).
- 01-12 -2004 Augusta ziekt en beheersing (KAVB Studiegroep Noordelijke Zandgebied, ca. 50 tulpentelers)

2005

Artikelen

Bijman, V.P., Derks, A.F.L.M., Blom-Barnhoorn, G.J., De Boer, M. en Pham, K.T.K., 2005. Recente ontwikkelingen bij Augustaziekte in tulp in Nederland. Gewasbescherming 36 supplement: 49 S.

Pham, K., Bijman, V.P., Van der Vlugt, R.A.A., Schroot, J. en Derks, A.F.L.M., 2005. Detectiemethode voor Olpidium in substraatoplossingen en grondmonsters. Gewasbescherming 36 supplement: 64 S.

Bijman, V., Derks, T. en Koster, A., 2005. Tussenstand fungicidenonderzoek bij Augustaziekte. BloembollenVisie 60: 22.

Presentaties bij Open Dagen

PPO broeierij, Lisse: 10 en 11 februari 2005

PPO open teelt, Lisse: 27 mei 2005. Info Augusta

Bijlage 1 Eindrapportage LNV project 320838

Programmanummer en titel: 397 III, Detectie, monitoring, risicobenadering en -perceptie en ondersteuning van fytosanitaire taken
Projecttitel: Olpidium detectie ter bestrijding van virusverspreiding
Projectnummer: 32
Projectleider: A.F.L.M. Derks (PPO-Bloembollen)
Adres: Postbus 85, 2160 AB Lisse
Tel.: 0252-462172
Fax: 0252-462100
E-mail Toon.Derks@wur.nl

Uitvoerende instellingen: PPO-Bloembollen, PRI
Gebruiker van de resultaten[1]: telers, voorlichters, onderzoekers, diagnostiek loketten, e.a.
Contactpersoon van de doelgroep: René Klaver en Hans Smal (tulpentelers)

Doel en beknopte inhoudelijke beschrijving: aan welke beleidsopgave(n) van LNV levert het project een bijdrage en welke kennisvragen die aan de beleidsopgave(n) gekoppeld zijn worden beantwoord met de uitkomsten van het project?

Water- of substraatcultures (met een circulatiesysteem) zijn een ideaal medium voor de zwermsporen van Olpidium-soorten om zich te verplaatsen. Olpidium sporen kunnen de dragers (vectoren) zijn van verschillende virussen, die dan met behulp van de zwemspoor de plantenwortel binnendringen en de virus zich kan gaan ontwikkelen. Zwemsporen kunnen dus besmet zijn met virussen. Op deze wijze is een explosieve verspreiding van diverse virussen geconstateerd in kasgewassen als komkommer, sla en fresia. Bij de (water)broei van tulpen speelt voor zover bekend alleen *O. brassicae* een rol in de verspreiding van TNV en/of andere necrovirussen. Meestal wordt virusverspreiding bij tulpen niet geconstateerd tijdens de waterbroei. Echter de enorme toename van Augustaziekte in tulpen in de laatste jaren doet vermoeden dat het gebruik van afgebroeide bollen als uitgangsmateriaal een belangrijke oorzaak van deze toename is; door de korte trekduur van broeitulpen kan de virusverspreiding pas zichtbaar worden bij nateelt. Om een effectieve gewasbeschermingsstrategie te ontwikkelen is er behoefte aan een toets ter detectie en identificatie om vast te stellen of, wanneer en in welke mate (virusbesmette) Olpidium voorkomt in water- en substraatcultures van tulp. Voor watercultures is hierbij een concentratiestap nodig, waarvoor gebruik gemaakt zal worden van filters. Nagegaan zal worden of deze filtertechniek in principe gebruikt kan worden om virusverspreiding via circulatiesystemen tegen te gaan. Met deze detectie- en filtermethoden wordt gericht op een beheersstrategie met zo min mogelijk chemische middelen en een hogere opbrengst bij teler/broeier.

Resultaten en kennisoverdrachtactiviteiten :
Resultaten

- bereikte resultaten over de totale projectperiode

Er werd begonnen in 2002 met een verkennend onderzoek naar de mogelijke primers voor een toets. Een detectiemethode voor Olpidium-soorten is ontwikkeld op basis van PCR met algemene schimmel generieke ITS primers. Daarnaast is een DNA-extractiemethode voor grondmonsters toepasbaar gemaakt voor de detectie van Olpidium met deze PCR-methode. Deze combinatie van methoden is in 2004 ingezet bij de analyse van grondmonsters in het epidemiologisch onderzoek naar Augustaziekte in tulpen (een door PT gefinancierd project). Op basis van gensequenties zijn specifieke primers ontwikkeld die onderscheid maken tussen Olpidium brassicae en O. bornovanus. Diverse herkomsten van Olpidium brassicae en O. bornovanus zijn opgekweekt en met deze primer sets getoetst.
Er is een eerste inventarisatie van filtratiesystemen gemaakt. Zo'n systeem is noodzakelijk om de sporen van

[1] Wees bij gebruikersgroep zo specifiek mogelijk. LNV als gebruiker is bijv. te vaag.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Olpidium in oplossing te kunnen concentreren.

1. In 2003 is een PCR-toets ontwikkeld voor Olpidium. De primers zijn gebaseerd op de sequentie van het ITS 2 primer -gebied. De ITS primers waren geschikt voor een *Olpidium brassicae* specifieke toets. De PCR bleek eerder niet gevoelig genoeg voor de directe detectie van deze schimmel in water- en substraatcultures. De detectie is daarom gericht op het retentaat, datgene wat achterblijft op de filter (maaswijdte 0,22 µ) nadat een substraatoplossing de filter is gepasseerd. Substraatoplossingen zijn verzameld van bakken met broeitulpen waarin wel en geen Augustaziekte is geconstateerd. Op de substraatoplossingen zijn ook Solanum villosum-plantjes gezet. Dit is een biotoets voor Olpidium (ter validatie van de PCR): met een microscoop worden de wortels gecontroleerd op de aanwezigheid van Olpidium rustsporen. De substraatoplossingen zijn met ELISA getoetst op het voorkomen van het tabaksnecrosevirus. Voor de detectie van Olpidium in grondmonsters werd de grond in water opgenomen, geroerd en na bezinken gesplitst in bovenstaande vloeistof en bezinksel. Het bezinksel werd op een zeef (maaswijdte 0,2 mm) nagespoeld en getest. De bovenstaande vloeistof werd gecentrifugeerd en de pellet getest evenals het retentaat van de bovenstaande vloeistof na passage door de filter met maaswijdte van 0,22 µ. Sommige retentaten van de substraatmonsters bij telers vandaan en van wortelextracten van toetsplanten met Olpidium leverden een positief resultaat met de PCR-methode. Met een nested PCR kon de Olpidium worden aangetoond in de substraatoplossingen, waarop besmette tulpen hadden gestaan, en in wortelextracten met Olpidium. Hierbij waren alle negatieve (interne) controles negatief in de test. In de substraatoplossingen, waarop Augustazieke tulpen zich ontwikkelden, kon het tabaksnecrosevirus met ELISA worden aangetoond. Validatie van PCR-toets volgde in combinatie met filtratietechniek in proefverband en in praktijk. Hiervoor werden gedurende de broei periode en in de zomermaanden monsters vanuit de praktijk verwerkt. Bij de praktijkmonsters en proeven met in water opgenomen grondmonsters kon de Olpidium worden aangetoond met een nested PCR in de organische fractie (na passage door een zeef van 0,2 mm maaswijdte). De schimmel werd ook aangetoond in de pellet na centrifugeren, maar niet in het retentaat. Met deze methode kunnen in een grondmonster de rustsporen en zoösporangia worden aangetoond (organische fractie) en waarschijnlijk ook de zwermsporen, die het virus overbrengen (pellet na centrifugeren). De resultaten van de toets zijn moeilijk om (statistisch) te interpreteren en te verwerken. Hieraan ligt de verdeling van de sporen van Olpidium over de wortels ten grondslag. Deze is zeer onregelmatig en moeilijk te voorspellen. De toets moet dan ook in meerdere herhalingen worden uitgevoerd om uitspraken te kunnen doen van kwantitatieve aard
2. Het project heeft tot spin off projecten bij het bedrijfsleven geleid. Er zal echter nog aan de verfijning van de proef moeten gewerkt worden om het rendabel en verantwoord verder te verhogen
3. De PD kan de toets aanpassen voor opzet detectie van wratziekten bij aardappel. De schimmels zijn nauw verwant en zijn beide grondgebonden. Rustsporen lijken erg veel op elkaar en zijn door de symptomen op de aardappel knol uiteindelijk wel te onderscheiden

- wat beloofd/wat gerealiseerd,

Er is beloofd dat watermonsters en grondmonsters zouden kunnen worden geanalyseerd en dat is ook gerealiseerd. Dit is mede te danken aan het PT Project, Epidemiologie van Augustaziek bij tulpen, dat gelijktijdig liep met het LNV project en als contra financiering is gebruikt. Uit de resultaten blijkt dat er meer onderzoek nodig is om tot betrouwbare uitspraken te komen ivm de onevenwichtige verdeling van de rustsporen over de wortels van een plant en het wisselvalige voorkomen van de schimmel in de grond. De ondergrens van de toets is nog niet met zekerheid te bepalen. Aan het filtersysteem hangen nog veel haken en ogen en wordt op dit moment door de broeiers niet als een optimale benadering ervaren. Daarom zijn er bij PPO ander opties ingezet (zeven en centrifigeren) van de grondmonsters, naast filteren om nagegaan of de toets te verwezenlijken is. De toets is overgenomen door de NAK Tuinbouw en is in samenwerking met PPO ook nader onderzocht voor aanpassing voor een verdelingsbedrijf en een gewasbeschermingsmiddelenbedrijf. Verondersteld wordt dat de BKD ook deze detectie methode zal gaan toepassen. Toets wordt benut voor PT project ´Epidemiologie van Augustaziekte in Tulp`, projectnummer 320657

Kennisoverdracht

Presentaties:

19-2-2003, Lauwersoog. Lezing voor tulpentelers in N.O.-Nederland. A.F.L.M. Derks: "De ins en outs van Augusta in tulp"

1-4-2003, Lisse. V. Bijman, A. Derks en G. Blom-Barnhoorn: Halfjaarlijkse bespreking proeven, resultaten en voortzetting programma met de Begeleidingscommissie Augustaziekte

26-6-2003, Wageningen. R. van der Vlugt: Bespreking tussentijdse resultaten en evaluatie. Klankbordgroep programma 397 III

20-8-2003, De Goorn. V. Bijman, A. Derks en G. Blom-Barnhoorn: Halfjaarlijkse bespreking met Begeleidingscommisie Augustaziekte

13-1-2004, Kollumerwaard. Lezing van A. Derks o.a. over Augustaziekte in tulpen voor ca. 40 tulpentelers in N.O.Nederland.

27-5-2004, Lisse. V. Bijman en A. Derks: Halfjaarlijkse bespreking van proeven, resultaten en voortzetting programma met de Begeleidingscommissie Augustaziekte.

10-03-2005, Wageningen, Vincent Bijman, Recent development of Augusta disease in tulips, Dutch-German Virologist Congres

27-04-2005 Ede, Poster voor Gewasbeschermingsmanifistatie

Publicaties:

V.P. Bijman, A.F.L.M. Derks en G.J. Blom-Barnhoorn, 2003. Augustaziekte tast tulp weer aan. Vakblad voor de Bloemisterij 17: 56

V. Bijman, A. Derks en G. Blom-Barnhoorn, 2003. Bodemaspecten bij Augustaziek. BloembollenVisie 18: 22-23

Open dagen

Feb 2003 Opendagen broeierij

Mei 2003 Opendagen vollegrondsteelt voorjaarsgewassen

Feb 2004 Opendagen broeierij

Mei 2004 Opendagen vollegrondsteelt voorjaarsgewassen

10-2-2005 + 11-2-2005, Open dagen Broei Lisse, poster presentatie

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bijlage 2 Artikel Gewasbescherming

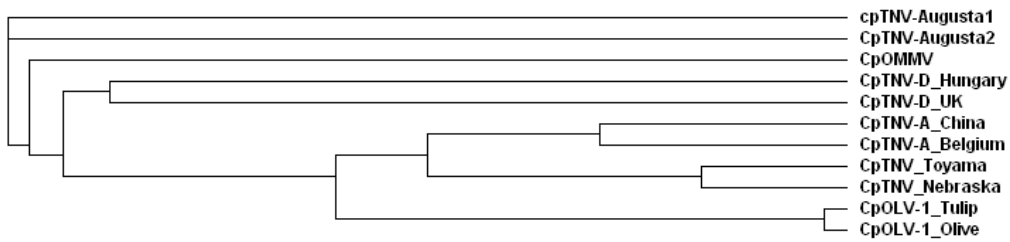
Augustaziekte in tulpen: een intrigerende virusziekte

A.F.L.M. Derks, K.T.K. Pham, M.E.C. Lemmers, G.J. Blom-Barnhoorn, V.P. Bijman en C.C.M.M. Stijger.
PPO-Bloembollen, postbus 85, 2160 AB Lisse, Ineke.Stijger@wur.nl

In de periode 2001-2003 nam het Augustaziek epidemische vormen aan. In sommige tulpenpartijen werd zelfs meer dan 70% zichtbaar ziek waargenomen. Maar net zo plotseling als de virusepidemie opkwam, zo snel verdween deze weer na 2003. Terugkijkend in de geschiedenis van de tulpenteelt lijkt er een periodiciteit te zijn in de uitbraak van deze ziekte en wel met een interval van ca. 8-10 jaar. In 2002 werd er opnieuw onderzoek gestart bij PPO-bloembollen naar deze virusziekte met financiering door zowel het Productschap Tuinbouw (epidemiologische deel van de ziekte) als het Ministerie van LNV (detectiemethoden). In dit artikel wordt een overzicht gegeven van deze en eerdere onderzoeken.

Ziektebeeld en oorzaak
Augustaziekte werd in tulpen voor het eerst waargenomen in 1928, waarbij in eerste instantie gedacht werd aan een aantasting door *Botrytis tulipae*. Drie jaar later veroorzaakte de ziekte een volledig misgewas in de cultivar Augusta. Aan deze cultivar heeft de ziekte haar naam te danken.
Op de bladeren komen bij deze ziekte necrotische strepen en vlekken voor. Bij een ernstige aantasting blijven de planten achter in groei, zijn misvormd en sterven vroegtijdig af, waardoor zij geen of vrijwel geen nieuwe bollen produceren. Dit is het oudst bekende beeld van Augustaziek, nu aangeduid met “vroeg Augusta” vanwege symptoomvorming al kort na opkomst van het gewas**.**
Daarnaast is er een ziektebeeld waarbij de planten hun normale lengte bereiken en de necrotische vlekken en strepen pas op de bladeren zichtbaar worden tijdens of na de bloei. De planten sterven ook eerder af dan gezonde planten. Dit gematigder ziektebeeld wordt “laat Augusta” genoemd en is naar voren gekomen nadat de tulpenteelt zich voor een groot deel verplaatst heeft van zandgronden naar zware zavelgronden.
Behalve op de bladeren kunnen ook op de bloemen smalle strepen zichtbaar worden; in ernstige gevallen zijn de bloemen misvormd. Op de nieuwgevormde bollen kunnen glazige of bruine vlekken zichtbaar zijn, maar dit is zeker niet bij alle cultivars het geval.
In de oorlogsjaren werd het Augustaziek in tulpen steeds meer waargenomen en werd er voor het eerst intensief onderzoek aan gedaan (de Bruyn Ouboter en van Slogteren, 1949). Er werd vastgesteld dat de ziekte grondgebonden is, vaak pleksgewijs optreedt en veroorzaakt wordt door tabaksnecrosevirus(sen).

Identificatie en detectie
Op basis van serologisch onderzoek worden er twee typen van het tabaksnecrosevirus (TNV) onderscheiden, namelijk serotype A en D (Meulewater et al., 1994). In Nederland komt in tulpen vrijwel alleen serotype D voor wanneer er met de twee typen antisera wordt getoetst.
Op grond van de manteleiwitsequenties zijn de verschillende isolaten uit tulp eerst gekarakteriseerd als TNV type D, maar na vergelijking met recent onderzoek (Cardoso et al, 2005) blijken de nucleotidensequenties meer homologie te hebben met die van het *Olive mild mosaic virus* (OMMV; 98% homologie, figuur 1). Bij de bepaling van de basenvolgorde van een ander gen, het RNA-afhankelijk RNApolymerasegen, blijken de onderzochte virusisolaten uit tulpen met Augustaziek zeer nauw verwant met OMMV en niet met TNV-D. Dit geldt voor 3 verschillende virusherkomsten geïsoleerd over een periode van ca. 20 jaar.



© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Figuur 1 Phylogenetische analyse van Augusta TNV in vergelijking met andere necrovirussen

In Japan is in tulpen naast een TNV-isolaat (TNV-Toyama) ook *Olive latent virus 1* (OLV1) geïsoleerd. Met moleculaire technieken zijn er dus tot nu toe drie necrovirussen geïdentificeerd in tulpen met Augustaziek.
Het TNV-D-antiserum (gemaakt tegen een virusisolaat uit Augustazieke tulpen) is goed te gebruiken bij de toetsing van tulpenbladeren met verdachte symptomen, dus voor identificatie doeleinden. Met dit antiserum zijn de tulpenbollen echter niet betrouwbaar te toetsen, voor een deel door de ongelijkmatige verdeling van het virus over bolbodem en bolrokken. Daarnaast zijn er cultivars waarin het virus niet of nauwelijks is aan te tonen in de bollen van zieke planten. Behalve dat de serologische boltoets het deels laat afweten is het nut van een boltoets om partijen te classificeren twijfelachtig omdat het virus maar voor een beperkt deel overgaat op de nieuwgevormde bollen.

Epidemiologie
TNV en OMMV (uit tulp) worden overgebracht in de grond door alleen de zwermsporen van de schimmel *Olpidium brassicae*. In de wortelzone van viruszieke planten komen virusdeeltjes vrij in het grondwater. Deze deeltjes hechten zich specifiek aan de buitenwand en flagel van de zwermsporen van *O. brassicae*. Direct na binnendringing van deze zwermsporen in de worteltoppen van een plant, komt het virus vrij en kan zich dan vermeerderen (Meulewater et al., 1994). Binnen 10-14 dagen ontstaan bij vatbare tulpencultivars necrotische plekken op de wortels. Waarschijnlijk door deze necrotisering van de wortels kan de *Olpidium* zijn cyclus niet voltooien; zoösporangia en rustsporen worden niet aangetroffen in deze wortels. In tulpen geteeld in het jaar na dergelijke Augustazieke tulpen is (vrijwel) nooit Augustaziek gevonden (van Slogteren en Visscher, 1967).
Bij later onderzoek in Japan werden echter wel zoösporangia en rustsporen aangetroffen in wortels van Augustazieke tulpen en werd virusoverdracht geconstateerd naar een volgteelt van tulpen (Nahata et al., 1988). Bij menging van pelafval van tulpen, bestaande uit bolhuiden, kleine bolletjes en wortelresten, door gestoomde grond bleek ook in Nederland wel degelijk virusoverdracht van tulp naar tulp mogelijk vooral in het geval van zware zavelgrond. De verschillen tussen het eerdere en latere onderzoek zit in de grondsoort waarop de tulpen werden geteeld en in het ziektebeeld (vroeg vs. laat Augusta). *O. brassicae* komt in alle grondsoorten voor tot op 30 cm diepte, maar in zandgronden minder frequent dan in zware zavelgronden.
In veel gevallen is een andere waardplant of combinatie van waardplanten (voor virus en vector) die tot een aantasting in tulpenpartijen leidt. Van zowel TNV als *O. brassicae* zijn veel waardplanten bekend. Diverse planten zijn waardplant voor zowel virus als vector. In het onderzoek in de oorlogsjaren kwamen vooral aardappel, boon en spinazie als risicovolle voorteelten naar voren (De Bruyn Ouboter en van Slogteren, 1949).
Tegenwoordig komt Augustaziek vooral voor bij tulpen, die jaar na jaar geteeld worden op vers gescheurd grasland. In de wortels van de meeste grassoorten is geen *O. brassicae* waargenomen, wel in de wortels van kweek en straatgras en onkruiden in het grasland, zoals herderstasje, melkdistel, muur, klaver en kamille. Door het scheuren van het grasland komen er waarschijnlijk veel zwermsporen tegelijk vrij, waardoor in een nat najaar bij temperaturen rond 10°C (optimaal voor vrijkomen van en verspreiding van zwermsporen) na het planten van de bollen een flinke virusverspreiding mogelijk is. De eerste resultaten met een voor *O. brassicae* ontwikkelde PCR-toetsmethode in grond wijzen op dat massaal vrijkomen van zwermsporen bij het scheuren van grasland.
Het optreden van Augustaziek in andere gebieden kan te maken hebben met partijen waarin het virus latent aanwezig is in combinatie met andere voorteelten. Als risicovolle voorteelten (naast de eerder genoemde) zijn o.a. te vermelden gerst, peen, chinese kool en sla.
Vanwege het periodieke karakter van de ziekte is nagegaan of er een relatie is tussen jaren waarin het Augustaziek epidemische vormen aanneemt en de meteorologische gegevens van de maanden september tot en met november (het plantseizoen) van de daaraan voorafgaande jaren. Er kon echter met de gemiddelde weergegevens (temperatuur en neerslag) van het betreffende gebied geen directe relatie worden gelegd.
Om de heftigheid van de epidemie in de jaren rond 2000 te kunnen verklaren, is nagegaan welke grote veranderingen in de tulpenteelt de jaren daarvoor hadden plaats gevonden. De meest opvallende verandering was in de broeierij, namelijk de overschakeling op waterbroei in plaats van teelt op potgrond. Daarbij komt dat de afgebroeide bollen vaak weer gebruikt worden als plantgoed en dan via waterbroei besmet kunnen zijn. Er was alle aanleiding toe om dit te onderzoeken omdat bij de teelt van freesia en sla in recirculatiesystemen een explosieve virusverspreiding kan plaats vinden bij besmetting van het recirculatiewater met *Olpidium.* In meerjarig onderzoek met zwaar besmette, Augustazieke partijen uit waterbroei en nateelt als plantgoed op *Olpidium*-vrije zandgrond werd geen Augustaziek geconstateerd. In de controle met broei op potgrond werd wel in beperkte mate Augustaziek waargenomen.

Symptoomexpressie
TNV en andere necrovirussen infecteren planten ondergronds. In veel gewassen, waaronder veel onkruiden, blijft het virus

tot de wortels beperkt en worden er in het bovengrondse gewas geen symptomen gevormd. De tulp, maar bijv. ook boon, vormen daarop een uitzondering met (heftige) ziektebeelden bovengronds (Meulewater et al., 1994). Toch komt het ook in tulpen frequent voor dat het virus beperkt blijft tot wortels en bol (Van Slogteren en Visscher, 1967; Nahata et al., 1988). De latente bolinfecties kunnen in een volgend jaar, wanneer de omstandigheden voor expressie gunstiger zijn, voor problemen zorgen in een oorspronkelijk gezond ogende partij.
Vroeg planten, begin oktober, leidt bij vatbare cultivars tot het “vroeg Augusta”. Bij laat planten, in november, komt dit beeld vrijwel niet voor, en ontwikkelt zich vooral na milde winters met weinig vorst het “laat Augusta” op de zware zavelgronden, maar (vrijwel) niet op zandgronden. Bij droog weer in mei blijft symptoomvorming vaak achterwege (Asjes, 1994). Het vroeg of laat planten geeft geen verschil in symptoomvorming te zien bij secundair ziek materiaal.
Bij doorteelt van Augustazieke partijen op zandgrond neemt het ziektepercentage aanmerkelijk af en bij teelt op zware zavelgrond juist toe. Deze toename wordt voor een deel veroorzaakt door virusverspreiding, want bij doorteelt op gestoomde zavelgrond (waardoor *Olpidium* wordt gedood) vindt er ook een afname in ziektepercentage plaats, hoewel niet zo sterk als op zandgrond (tabel 1). De afname van zichtbaar Augusta in een partij bij doorteelt is ook sterk cultivarafhankelijk

Tabel 1 Percentage planten met Augustaziek aantasting; cultivar Angelique en Inzell

Behandeling	Cultivar	Vroeg planten (1-10-02)	Laat planten (11-11-02)	Grondsoort	Percentage zieke planten
1	Angelique	+		zware grond	92
2	Angelique	+		zandgrond	12
3	Inzell	+		zware grond	88
4	Inzell	+		zandgrond	21
5	Angelique		+	zware grond	3
6	Angelique		+	zandgrond	0
7	Inzell		+	zware grond	2
8	Inzell		+	zandgrond	0
9 controle	Angelique	+		zware grond gestoomd	0
10 controle	Inzell	+		zware grond gestoomd	11

Symptomen worden in tulpen meer waargenomen op gronden of plekken met een slechte structuur en waarop regenwater langer blijft staan. Zulke plekken ontstaan bijv. door het aantrappen van een plek door koeien (voormalig grasland) of het keren met een tractor.
Tussen cultivars zijn er verschillen in vatbaarheid. Vatbare cultivars behoren o.a. tot de Triumph-tulpen en Darwinhybriden en weinig vatbare zijn te vinden bij bijv. vroege en Mendel-tulpen. Tijdens de epidemie rond het jaar 2000 waren cultivarverschillen minder goed zichtbaar door de heftigheid van de epidemie. Sommige, als weinig vatbaar bekend staande cultivars, zoals cv. Inzell, bleken toen ook tot de vatbare cultivars gerekend te moeten worden. Misschien heeft deze verschuiving te maken met de opgebouwde infectiedruk, omdat uit Japans onderzoek blijkt dat hogere virusconcentraties in tulpenwortels tot meer en heftiger ziektebeelden leiden (Nahata et al., 1988).

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.

Bestrijding en beheersing

Een van de belangrijkste methoden om Augustaziek in tulpen te beheersen is door de tulpen, vooral vatbare cultivars, laat (in november) te planten (Van Slogteren and Visscher, 1967). Bij de teelt op zware zavelgronden geeft deze methode de nodige problemen. Na perioden met veel regenval zijn deze gronden onbegaanbaar voor de plantmachines; daarom hebben telers de neiging vroeg te planten als de herfstbuien nog niet zijn begonnen. Ook het feit dat veel plantwerk wordt uitbesteed aan loonwerkers maakt het vroeg planten moeilijk inpasbaar.

Het gebruik van schoon plantgoed (zonder wortelresten) en het verwijderen van zichtbare zieke planten in een zo vroeg mogelijk stadium zijn op zich effectieve beheersmaatregelen. Het verwijderen van zieke planten is echter op de zware zavelgronden, zeker bij de teelt van tulpen in netten, praktisch niet toepasbaar.

De keuze voor minder vatbare cultivars is op zich ook een mogelijkheid. Onderzoek naar het verhogen van de weerstand van tulpen tegen Augustaziek door dompeling in en bespuiting met harpin (is een eiwit, dat mogelijk resistentie in tulp induceert) hebben geen positief resultaat opgeleverd.

Het onderzoek naar grondontsmetting met diverse chemische middelen en toepassing van kalkstikstofbemesting heeft deels tegenstrijdige resultaten opgeleverd en verder weinig effectieve bestrijdingsmogelijkheden vooral op zware zavelgronden (Asjes and Blom-Barnhoorn, 1996). Onkruidbestrijding zou misschien effectiever kunnen zijn, omdat daar veel waardplanten van het virus en/of de vector tussen zitten.

Recent is geëxperimenteerd met het hakselen en onderspitten van bepaalde tussengewassen. Sarepta-mosterd leek in eerste instantie een gunstig effect te hebben, maar mogelijk is gele mosterd beter omdat hierbij in de wortels minder *Olpidium* werd vastgesteld. Daarnaast zijn er ook minder planten met symptomen van Augustaziek in de behandelingen met gele mosterd waargenomen. Aan de andere kant kunnen bepaalde voorgewassen beter vermeden worden omdat deze een waardplant zijn voor zowel virus als vector, bijv. aardappel, boon, gerst en gescheurd grasland. Dat laatste is in bepaalde gebieden in Noord-Holland juist een standaard teeltmethode.

Een bestrijding met behulp van een Pseudomonas bacterie biedt in principe een mogelijkheid om Augustaziek in tulpen te bestrijden. De biosurfactant, die deze bacterie produceert, pakt de *Olpidium* zwermsporen aan. De toevoeging van deze bacterie aan het standaard ontsmettingsbad voor tulpenbollen leverde betere resultaten op dan de toepassing van deze bacterie alleen. In hoeverre deze bacterie op commerciële schaal is te produceren, is bepalend voor latere toepassing in de praktijk.

Drainage van gronden is in Japan een mogelijkheid gebleken om virusverspreiding te beperken (Nahata et al., 1988). Het telen van een partij op zandgrond, vaak vrij van *Olpidium*, is een mogelijkheid om een partij op te knappen. Het uitrijden van pelafval en grond over akkers dient vermeden te worden, tenzij dit eerst wordt gecomposteerd.

Augustaziek in tulpen blijft een intrigerende virusziekte door het wisselvallige karakter van de ziekte qua moment van verschijnen en mate en moment van symptoomexpressie. Er zijn ondanks vele vorderingen in het onderzoek nog diverse zaken de moeite van het onderzoek waard om telers een handvat te geven bij het beheersen van deze ziekte.

© Praktijkonderzoek Plant & Omgeving B.V.